

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

CHROMOSOMALE IMBALANCEN AN GENORTEN FÜR  
TRANSKRIPTIONSFAKTOREN ALS URSACHE DER „LOST-B-CELL-IDENTITY“  
VON HODGKIN-/REED-STERMBERG-ZELLEN

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

BIRTE MALAIKA OVERBECK

aus Wedel

Kiel 2014

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Siebert
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. M. Kneba
Tag der mündlichen Prüfung:	14.04.2015
Zum Druck genehmigt, Kiel, den	14.04.2015

gez.: Prof. Dr. J. Roider  
(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Schreibweisen.....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Hodgkin-Lymphom .....	1
1.1.1 Geschichtliche Aspekte .....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Ätiologie.....	2
1.1.4 Histologie und Klassifikation.....	4
1.2 Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms.....	6
1.2.1 B-Zell-Entwicklung.....	6
1.2.2 Immunphänotyp der HRS-Zellen .....	7
1.2.3 Abstammung von B-Zellen .....	7
1.2.4 Verlust der B-Zell-Identität der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen .	8
1.3 In dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktoren .....	11
1.3.1 <i>ETS1</i> .....	11
1.3.2 <i>BCOR</i> und <i>BCORL1</i> .....	13
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	14
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1 Material.....	16
2.1.1 Gewebeproben.....	16
2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien .....	18
2.1.3 Puffer und Lösungen .....	19
2.1.4 Kits .....	20
2.1.5 Geräte und Ausrüstung .....	20
2.1.6 Antikörper für FICTION.....	21
2.1.7 DNA-Sonden für FICTION.....	21
2.1.7.1 Kommerziell erhältliche FISH-Sonden .....	21
2.1.7.2 Selbst hergestellte FISH-Sonden .....	22

2.2	Methoden.....	23
2.2.1	Angewendete molekularzytogenetische Verfahren zur Untersuchung des Hodgkin-Lymphoms.....	23
2.2.1.1	Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	23
2.2.1.2	Prinzip der kombinierten Immunphänotypisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FICTION).....	23
2.2.2	Präparation von BAC-DNA.....	24
2.2.3	DNA-Quantifizierung .....	24
2.2.4	Vorbereitung der Nukleotidmischung für die DNA-Markierung.....	24
2.2.5	Markierung der DNA-Proben .....	24
2.2.6	Reinigung der markierten DNA-Proben .....	25
2.2.7	Vorbereitung der DNA-Sonden.....	25
2.2.8	Anwendung der FICTION-Methode.....	25
2.2.8.1	CD30-Immunphänotypisierung .....	26
2.2.8.2	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung .....	27
2.2.8.3	Auswertung der FICTION-Präparate .....	27
2.2.8.4	<i>ETS1</i> -Signalkonstellation .....	29
2.2.8.5	<i>BCOR</i> - und <i>BCORL1</i> -Signalkonstellation.....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>30</b>
3.1	Nachweis von <i>ETS1</i> -Deletionen .....	30
3.1.1	<i>ETS1</i> -Deletionen bei cHL-Zelllinien.....	30
3.1.2	<i>ETS1</i> -Deletionen bei primären cHL-Fällen .....	30
3.1.3	Weitere Ergebnisse der <i>ETS1</i> -Analysen .....	32
3.2	Nachweis von <i>BCOR</i> - und <i>BCORL1</i> -Deletionen .....	32
3.2.1	<i>BCOR</i> - und <i>BCORL1</i> -Deletionen bei primären cHL-Fällen .....	33
3.2.2	Weitere Ergebnisse der <i>BCOR</i> - und <i>BCORL1</i> -Deletionen .....	34
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>35</b>
4.1	Verlust der B-Zell-Identität .....	35
4.2	Methodisch-technische Aspekte .....	35
4.2.1	Deletionen des Transkriptionsfaktors <i>ETS1</i> .....	36
4.2.2	Deletionen der Transkriptionsfaktoren <i>BCOR</i> und <i>BCORL1</i> .....	39
4.3	Fazit.....	40
4.4	Ausblick .....	41

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Danksagungen .....</b>	<b>104</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf und Veröffentlichungen .....</b>	<b>105</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Physikalische Einheiten wurden mit den internationalen SI (Système international d'unités)-Einheiten abgekürzt und werden im Abkürzungsverzeichnis nicht weiter erläutert.

Abb.	Abbildung
ABF1	activated B-cell factor 1
AML	akute myeloische Leukämie
APL	akute Promyelozyten-Leukämie
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Array-CGH	Array-basierte komparative genomische Hybridisierung
B	blau
BAC	bacterial artificial chromosom (künstliches Bakterienchromosom)
BCOR	BCL6 corepressor
BCORL1	BCL6 corepressor-like 1,
BCR	B-cell receptor (B-Zell-Rezeptor)
Bp	Basenpaare
BSAP	B-cell-specific activator
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation (internationales System zur Bezeichnung von Differenzierungsantigenen)
CEP	Centromersonde
cHL	klassisches Hodgkin-Lymphom
Cot-1-DNA	DNA mit hohem Anteil repetitiver Sequenzen
CSF1R	CSF1-Rezeptor
CtBP	C-terminal binding protein
DAPI	4' G-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DLBCL	diffus großzellige B-Zell-Lymphome
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EBF	early B cell factor
EBNA1	EBV nuclear antigen 1
EBS	ETS binding site (ETS-Bindungsstelle)
EBV	Epstein-Barr-Virus
ETS1	v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1

FICTION	Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasia
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FLI1	Friend Leukemia Integration 1
G	grün
HL	Hodgkin-Lymphom
ID2	inhibitor of differentiation and DNA binding 2
HIV	human immunodeficiency virus (humanes Immundefizienz-Virus)
HRS	Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen
IGH	Immunglobulin-Schwerkettenloкус
LMP1	latent membrane protein 1
LMP2A	latent membrane protein 2A
LP-Zellen	Lymphozyten-prädominante Zellen
m, ♂	maskulin
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor (Monozytenkolonien-stimulierender Faktor)
MRD	minimale Resterkrankung
mRNA	messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
NLPHL	noduläres lymphozytenprädominantes Hodgkin-Lymphom
O	orange
p-Arm	kurzer Chromosomenarm
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
q-Arm	langer Chromosomenarm
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
SA	Spectrum Aqua (blauer Fluoreszenzfarbstoff)
SG	Spectrum Green (grüner Fluoreszenzfarbstoff)
SO	Spectrum Orange (roter Fluoreszenzfarbstoff)
STAT5A	signal transducer and activator of transcription 5A
STAT5B	signal transducer and activator of transcription 5B
Tab.	Tabelle
TF	Transkriptionsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
w, ♀	weiblich
WHO	World Health Organization (Weltgesundheitsorganisation)

## SCHREIBWEISEN

<i>KURSIV GROSS</i> (z.B. <i>ETS1</i> )	humanes Gen/DNA/RNA
NORMAL GROSS (z.B. ETS1)	humanes Protein
<i>Kursiv klein</i> (z.B. <i>Ets1</i> )	murines Gen/DNA/RNA
Normal klein (z.B. Ets1)	murines Protein

# **1 Einleitung**

Maligne Lymphome sind Neoplasien des lymphatischen Gewebes, die sich aus den B- und T-Zell-Populationen der primären, sekundären und sekundär besiedelten lymphatischen Organe entwickeln (Böcker, Denk et al., 2012).

Innerhalb der Gruppe der Lymphome werden folgende Subgruppen unterschieden:

- Hodgkin-Lymphome (HL) und
- andere B- und T-Zell-Lymphome, häufig unter dem Begriff Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) zusammengefasst.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Hodgkin-Lymphom.

## **1.1 Hodgkin-Lymphom**

### **1.1.1 Geschichtliche Aspekte**

Das Hodgkin-Lymphom wurde bereits 1832 von Thomas Hodgkin in seiner Veröffentlichung „On Some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen“ beschrieben, welche in einer Ausgabe der Medico-Chirurgical Transactions, Fachzeitschrift der Royal Medical and Chirurgical Society of London, gedruckt wurde. Hodgkin beschreibt darin sieben Fälle von Patienten mit vergrößerten Lymphknoten und Splenomegalie (Hodgkin, 1832).

Der Begriff des „Hodgkin's Disease“ wurde später von dem britischen Arzt Samuel Wilks geprägt, der 1865 ebenfalls einen Artikel über die Erkrankung veröffentlichte (Wilks, 1865). In den Jahren 1898 und 1902 beschrieben Carl Sternberg und Dorothy Reed die, für das Hodgkin-Lymphom pathognomonischen, multinukleären Zellen (Sternberg, 1898, Reed, 1902). Heute werden die malignen Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) als Hodgkin-Zellen (mononukleär) und Reed-Sternberg-Zellen (multinukleär) bezeichnet und unter der Abkürzung „HRS“ zusammengefasst.

### **1.1.2 Epidemiologie**

Weltweit sind etwa 3-4 % der malignen Erkrankungen Lymphome, an denen das Hodgkin-Lymphom einen Anteil von etwa 20 % hat (Ferlay, Shin et al., 2010). In Europa werden jährlich 2,1-2,5 Fälle pro 100.000 Einwohner diagnostiziert (Ferlay, Parkin et al., 2010) und in Deutschland erkranken jedes Jahr etwa 1.040 Männer und 940 Frauen (siehe Abbildung 1) (Robert-Koch-Institut, 2010). Auch weltweit lässt sich diese Tendenz einer erhöhten Inzidenz beim männlichen Geschlecht nachvollziehen (Ferlay, Shin et al., 2010).



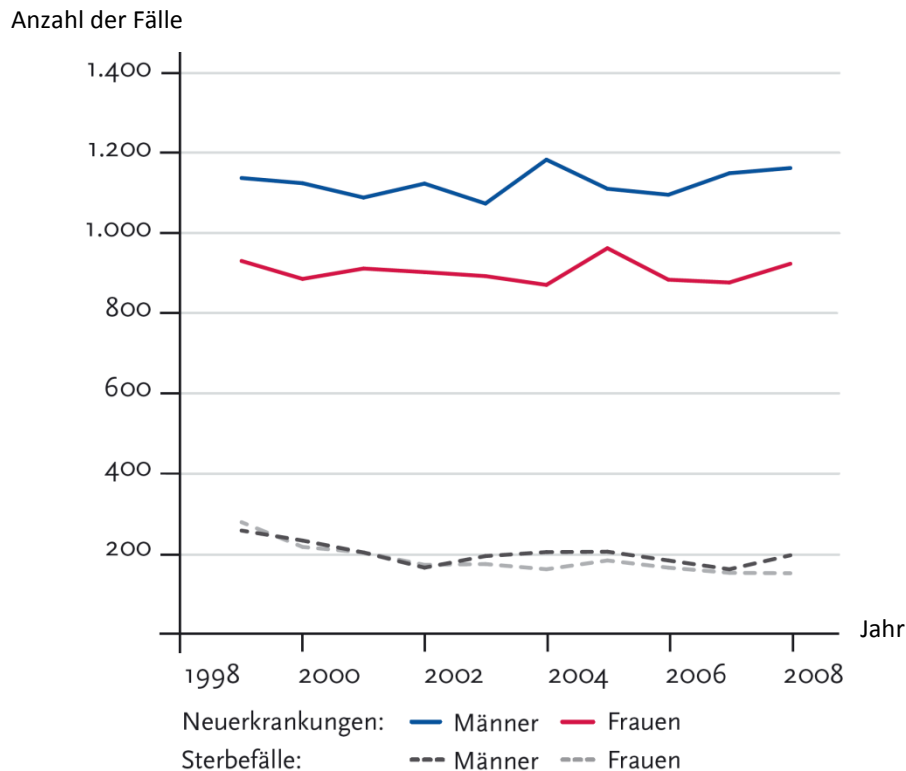


Abb. 1 Hodgkin-Lymphom: Absolute Zahl der Neuerkrankungs- und Sterbefälle, Deutschland 1999-2008, modifizierte Abbildung (Robert-Koch-Institut, 2012)

Bei einem Teil der Hodgkin-Lymphome lässt sich eine Assoziation mit EBV (Epstein-Barr-Virus) nachweisen, bei der Hinweise auf eine bimodale Verteilung mit einer Häufung um das 16.-24. Lebensjahr sowie in der Gruppe der über 50-Jährigen gefunden wurden. EBV-negative Fälle hingegen zeigen eine unimodale Verteilung mit einer deutlichen Häufung im jungen Erwachsenenalter um das 20.-30. Lebensjahr (Jarrett, 2002).

### 1.1.3 Ätiologie

In den letzten Jahrzehnten gab es zahlreiche Forschungsansätze zur Aufklärung der Mechanismen, die zur Entstehung des Hodgkin-Lymphoms führen. Dennoch konnten diese noch nicht hinreichend geklärt werden. Die Assoziation von EBV mit einem Anteil der HL-Fälle wurde nachgewiesen (Gulley, Eagan et al., 1994, Kanzler, Küppers et al., 1996, Glaser, Lin et al., 1997). Es ist bekannt, dass ca. 20-40 % der HL-Fälle in der westlichen Welt und mehr als 60 % der Fälle in Südamerika und Asien EBV-positiv sind (Gulley, Eagan et al., 1994, Glaser, Lin et al., 1997). Patienten mit durch EBV ausgelöster infektiöser Mononukleose haben in den darauffolgenden zwei Jahrzehnten ein bis zu 3,5fach erhöhtes Risiko, an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken (Hjalgrim, Askling et al., 2000). In EBV-assoziierten

Fällen sind die HRS-Zellen mit dem Virusgenom infiziert und die Klonalität dieser Zellen wurde erwiesen (Uhara, Sato et al., 1990, Gledhill, Gallagher et al., 1991). Das Epstein-Barr-Virus ist in der Lage, B-Zellen im Keimzentrum, die aufgrund eines fehlenden B-Zell-Rezeptors (BCR) der Apoptose zugeführt würden, zu immortalisieren (Bechtel, Kurth et al., 2005, Chaganti, Bell et al., 2005, Mancao, Altmann et al., 2005). In EBV-positiven Fällen konnten in den HRS-Zellen unter anderem EBNA1 (EBV nuclear antigen 1), das für die Replikation des viralen Genoms notwendig ist, sowie LMP1 und LMP2A (latent membrane proteins 1 und 2A) nachgewiesen werden (Middleton, Gahn et al., 1991, Deacon, Pallesen et al., 1993, Grasser, Murray et al., 1994, Niedobitek, Kremmer et al., 1997). Das bekannte onkogene Potential des Proteins LMP1, welches unter anderem die Expression von antiapoptotischen Faktoren induziert, lässt auf eine direkte Beteiligung an der Pathogenese des Tumors schließen (Kulwichit, Edwards et al., 1998). LMP2A hingegen kann einen aktivierten B-Zell-Rezeptor imitieren und so in einer BCR-negativen B-Zelle überlebenswichtige Signale auslösen (Caldwell, Brown et al., 2000). LMP2A reguliert außerdem die Expression von B-Zell-spezifischen Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen herunter und erhöht die Expression von proliferationsfördernden sowie Apoptose-inhibierenden Faktoren (Portis, Dyck et al., 2003, Portis and Longnecker, 2003). Diese Veränderungen ähneln aber sowohl denen von EBV-positiven als auch EBV-negativen HRS-Zellen, sodass der Einfluss von insbesondere LMP2A und EBV auf die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms weiterhin nicht vollständig geklärt ist (Portis, Dyck et al., 2003).

Das Hodgkin-Lymphom kann auch familiär gehäuft auftreten, dabei ist insbesondere das Risiko für gleichgeschlechtliche Geschwister erhöht (Kerzin-Storarr, Faed et al., 1983, Paltiel, Schmit et al., 2000, Goldin, Pfeiffer et al., 2004, Altieri and Hemminki, 2006).

Außerdem werden noch einige weitere Risikofaktoren diskutiert. Epidemiologische Studien aus den USA zeigen eine niedrigere Inzidenz in der afroamerikanischen und asiatischen Bevölkerung, zusätzlich gibt es Hinweise auf Tabakkonsum als weiteren Risikofaktor (Briggs, Hall et al., 2002, Shenoy, Maggioncalda et al., 2011). Auch HIV-positive Personen haben ein etwa 10-fach erhöhtes Risiko, an einem Hodgkin-Lymphom zu erkranken (Biggar, Jaffe et al., 2006).

#### 1.1.4 Histologie und Klassifikation

Die derzeit gültige Klassifikation des Hodgkin-Lymphoms ist die zuletzt 2008 aktualisierte Version der World Health Organization (WHO). Diese unterscheidet zwei Subgruppen: das klassische Hodgkin-Lymphom (cHL) mit den pathognomonischen HRS-Zellen (siehe Abb. 2) und das noduläre lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL). Das klassische Hodgkin-Lymphom, welches in etwa 95 % der Fälle vorliegt, unterteilt sich weiter in die folgenden vier histologischen Subtypen: nodulär-sklerosierende, gemischtzellige, lymphozytenreiche und lymphozytenarme Hodgkin-Lymphome (Swerdlow, 2008).

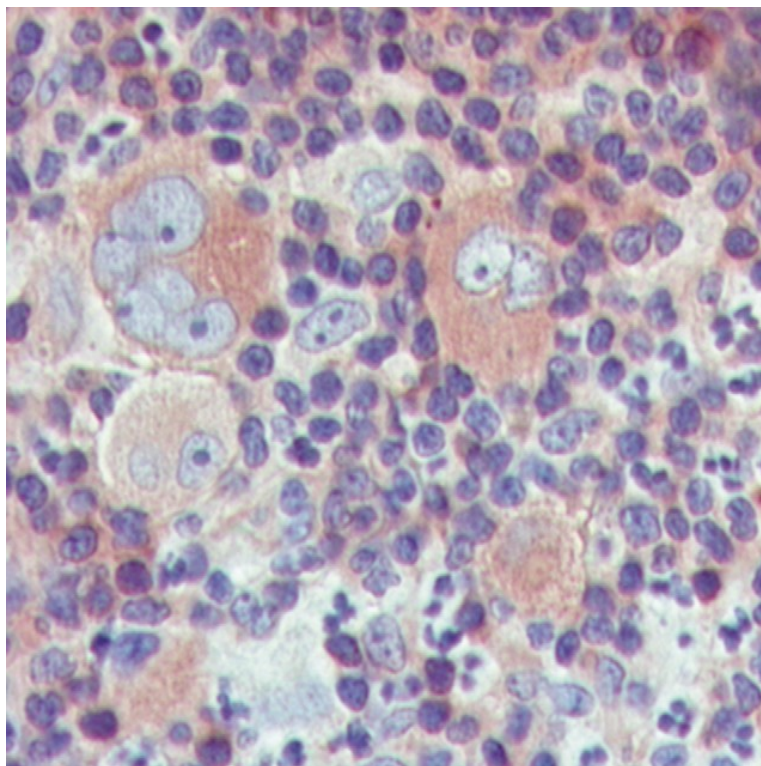


Abb. 2 Typische Morphologie der HRS-Zellen bei klassischem Hodgkin-Lymphom (Thomas, Re et al., 2004)

In der Mehrzahl der Fälle machen die pathognomonischen HRS-Zellen nur etwa 1 %, selten auch bis ca. 10 %, des zellulären Infiltrats aus. Die Zusammensetzung des Begleitinfiltrats variiert je nach Subtyp und setzt sich aus Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen, Epitheloidzellen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten zusammen (Swerdlow, 2008, Küppers, 2009, Böcker, Denk et al., 2012).

Das nodulär-sklerosierende Hodgkin-Lymphom ist mit ca. 70 % der häufigste Subtyp des cHL in Europa und den USA. Charakteristisch ist die hohe Sklerosierungs-

tendenz mit Bildung von nodulären Infiltratherden. Anhand des vorhandenen Gehalts an HRS-Zellen werden ein Typ 1 und Typ 2 (höhere Anzahl von HRS-Zellen) unterschieden. Das Verhältnis von männlichen und weiblichen Patienten beträgt in etwa 1:1 und die Erkrankung tritt gehäuft zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr auf (Swerdlow, 2008).

Der gemischtzellige Typ macht 20-25 % der klassischen Hodgkin-Lymphome aus und kommt häufiger bei HIV-infizierten Patienten sowie in den Entwicklungsländern vor. Das mediane Erkrankungsalter liegt bei 38 Jahren und 70 % der Erkrankten sind Männer. Bei diesem Subtyp fehlt die noduläre Sklerosierung, die HRS-Zellen sind umgeben von einem diffusen oder schwach nodulären Begleitinfiltrat (Swerdlow, 2008).

Der lymphozytenreiche Typ wird charakterisiert durch verstreute HRS-Zellen und ein noduläres, seltener diffuses Begleitinfiltrat, das vor allem aus kleinen Lymphozyten besteht und in dem neutrophile und eosinophile Granulozyten fehlen. Das histologische Bild dieses Subtyps ist dem des NLPHL sehr ähnlich, durch Immunphänotypisierung ist eine Unterscheidung aber eindeutig möglich. Der lymphozytenreiche Typ tritt ebenfalls wesentlich häufiger beim männlichen Geschlecht auf (70 % der Fälle) und liegt in ca. 5 % des cHL vor (Swerdlow, 2008).

Der lymphozytenarme Typ ist der seltenste Subtyp (weniger als 1 %). 60-75 % der Patienten sind männlich und das mediane Erkrankungsalter liegt bei 30-37 Jahren. Häufig ist der lymphozytenarme Typ mit einer HIV-Infektion assoziiert und tritt in Entwicklungsländern vermehrt auf. Dieser Subtyp zeichnet sich durch eine relativ hohe Dichte an HRS-Zellen im Vergleich zu den nicht-neoplastischen Lymphozyten des Begleitinfiltrats aus. Das Bild ist in der Regel diffus (Swerdlow, 2008).

Das noduläre lymphozytenprädominante Hodgkin-Lymphom (NLPHL) unterscheidet sich sowohl in der Klinik als auch in der zellulären Zusammensetzung, der Morphologie, dem Immunphänotyp und der Genetik vom klassischen Hodgkin-Lymphom. Es ist charakterisiert durch eine noduläre oder nodulär-diffuse Proliferation mit großen neoplastischen Zellen, die als Popcorn- oder Lymphozytenprädominante Zellen (LP-Zellen) bezeichnet werden. Insgesamt sind etwa 5 % aller Hodgkin-Lymphome NLPHL, betroffen sind vorwiegend Männer und die Altersgruppe von 30 bis 50 Jahren (Swerdlow, 2008).

In der hier vorliegenden Arbeit wird das klassische Hodgkin-Lymphom betrachtet.

## **1.2 Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms**

### **1.2.1 B-Zell-Entwicklung**

Die lymphatische Vorläuferzelle der B-Zelle stammt von einer pluripotenten hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks ab (Böcker, Denk et al., 2012). Hier beginnt die normale B-Zell-Entwicklung, wo es zunächst zu genetischen Umlagerungen in den DNA-Abschnitten kommt, die für die unterschiedlichen Bereiche der Antikörper kodieren und so für die Entstehung der Antikörpervielfalt sorgen. Dieser Schritt wird als Rearrangement bezeichnet. Die Umlagerungen erfolgen zuerst im Bereich der Gensegmente für die schweren H(heavy)-Ketten, im nächsten Schritt in den Gensegmenten für die leichten L(light)-Ketten der Antikörper (Rajewsky, 1996). Im Regelfall synthetisiert eine individuelle B-Zelle im Anschluss nur Antikörper gleicher Spezifität (Nossal and Lederberg, 1958). Die B-Zellen mit membranständigen Antikörpern, die also bereits BCR aufweisen, werden auch als naive B-Zellen bezeichnet, da sie noch keinen Kontakt mit einem Antigen hatten. B-Zellen, die im Knochenmark körpereigene Antigene als fremd erkennen bzw. anderweitig defekt sind, werden mittels Apoptose eliminiert (Rajewsky, 1996). Die noch naiven B-Zellen, die nicht autoreaktiv sind, wandern aus dem Knochenmark in die sekundär lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, solitäre Lymphfollikel und Peyer-Plaques des Darms). Bei einer antigenabhängigen Aktivierung der naiven B-Zellen entwickelt sich ein sogenanntes Keimzentrum. Dabei proliferieren die stimulierten, als Zentroblasten bezeichneten B-Zellen, und es findet die somatische Hypermutation statt, bei der es zur Mutation der Immunglobulingene kommt (Rajewsky, 1996). Die dadurch entstehenden, als Zentrozyten bezeichneten B-Zellen weisen BCR mit unterschiedlicher Affinität zum Antigen auf und werden anhand dieser erneut selektioniert. Zugleich kann sich in der Phase der Zentrozyten ein Isotypenwechsel ereignen, der die Funktion und Signalwege der BCR in der Immunantwort verändert (Feuillard, Taylor et al., 1995). Die überlebenden B-Zellen differenzieren sich zu Plasmazellen, die die Produktion von Antikörpern sicherstellen, und B-Gedächtniszellen, die bei einem erneuten Kontakt mit dem entsprechenden Antigen eine schnelle Sekretion von Antikörpern ermöglichen. (Klein and Dalla-Favera, 2008).

### **1.2.2 Immunphänotyp der HRS-Zellen**

Die HRS-Zellen des cHL weisen Merkmale verschiedener hämatopoetischer Zelllinien auf und zeigen einen stark variierenden Immunphänotyp (Trumper, Brady et al., 1993). Zu den häufigen Markern gehören die CD (Cluster of Differentiation)-Moleküle CD15, CD25, CD30, CD45 und CD71. CD15 findet sich üblicherweise auf Monozyten und Granulozyten, CD25 auf aktivierten B- und T-Zellen, CD45 auf Leukozyten und CD71 auf proliferierenden Zellen, Makrophagen sowie aktivierten B- und T-Zellen (Agnarsson and Kadin, 1989, Drexler, 1992). CD30 gehört zur Tumornekrosefaktor (TNF)-Rezeptor-Superfamilie, wird auch von aktivierten B- und T-Zellen exprimiert und kann sowohl proliferations- als auch apoptosefördernde Signalwege aktivieren (Clodi and Younes, 1997). CD30 wird von nahezu allen HRS-Zellen stark exprimiert und daher auch in der Diagnostik des cHL eingesetzt (Schwab, Stein et al., 1982, Drexler, 1992).

### **1.2.3 Abstammung von B-Zellen**

Üblicherweise behalten die malignen Zellen der B-Zell-Lymphome einige wichtige phänotypische und funktionale Merkmale der Zellen bei, von denen sie abstammen (Küppers, 2005). Die HRS-Zellen des cHL stellen dabei eine Ausnahme dar, wodurch ihre Herkunft lange ungeklärt blieb. Dabei ist die Kombination ihrer Oberflächenproteine mit keiner anderen Population des hämatopoetischen Systems vergleichbar (Trumper, Brady et al., 1993). Die geringe Anzahl von Tumorzellen in Biopsien von häufig weniger als 1 % erschwerte Studien zu ihrem Ursprung zusätzlich. Im Jahre 1994 konnte jedoch die Herkunft von den B-Zellen in der Mehrzahl der cHL-Fälle nachgewiesen werden. Mittels Single-Cell PCR (Polymerase Chain Reaction) wurde gezeigt, dass HRS-Zellen Umlagerungen im Immunglobulin-Schwerkettenloкус (IGH) tragen, die spezifisch für B-Zellen sind (Küppers, Rajewsky et al., 1994). Diese Umlagerungen machten auch den monoklonalen Charakter der HRS-Zellpopulation deutlich. Der Nachweis von somatischen Hypermutationen, inklusive Mutationen mit Funktionsverlust der Immunglobulin-Gene, deutet auf die Abstammung der HRS-Zellen von den präapoptotischen B-Zellen des Keimzentrums hin (Kanzler, Küppers et al., 1996).

Zu einem geringen Anteil von etwa 1-2 % der Fälle stammen die HRS-Zellen von T-Zellen ab (Muschen, Rajewsky et al., 2000, Seitz, Hummel et al., 2000).

Nachdem die Frage der Herkunft beantwortet wurde, zeigt sich, wie sehr der Immunphänotyp der HRS-Zellen von dem ihrer Ursprungszellen abweicht. Viele der

typischen B-Zell-Marker, wie z.B. CD19, CD20, CD22 und CD79a, werden gar nicht oder nur in einem kleinen Teil der HRS-Zellen exprimiert (Drexler, 1992, Korkolopoulou, Cordell et al., 1994, Watanabe, Yamashita et al., 2000).

#### 1.2.4 Verlust der B-Zell-Identität der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen

Der B-Zell-untypische Phänotyp bei HRS-Zellen zeigt, dass verschiedene Signalwege gegenüber einer normalen B-Zell-Population verändert sind. Einige der Mechanismen, die zur Entstehung und Ausprägung dieses Phänotyps der HRS-Zellen beitragen, sind bereits identifiziert worden.

Diverse Transkriptionsfaktoren (TF), die Teil des B-Zell-Programms sind (siehe Abb. 3), werden in HRS-Zellen verringert oder gar nicht exprimiert, was eine entscheidende Rolle bezüglich des Verlusts der B-Zell-Identität der HRS-Zellen spielt. TF beeinflussen über die Expression von Genen die Entwicklung, Proliferation und Apoptose, und können so Einfluss auf grundlegende Prozesse in einer Zelle nehmen.

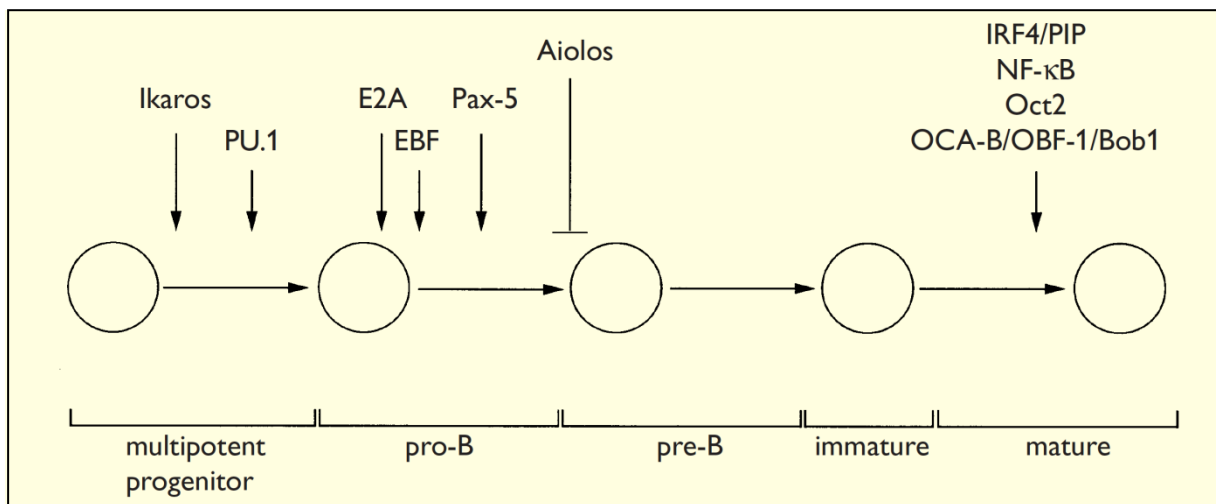


Abb. 3 Zeitpunkte der Einflussnahme verschiedener Transkriptionsfaktoren auf die B-Zell-Entwicklung (Kee, Quong et al., 2000)

Der TF PU.1, ein in der frühen B-Zell-Entwicklung und Differenzierung wichtiger TF, wird in HRS-Zellen nicht exprimiert und trägt so zum B-Zell-untypischen Phänotyp der Zellen bei (Torlakovic, Tierens et al., 2001).

In der weiteren B-Zell-Reifung spielt das *E2A*-Gen, welches die zwei TF E12 und E47 kodiert, eine wichtige Rolle (Kee, Quong et al., 2000). *E2A* wird zwar in HRS-Zellen exprimiert, ist in seiner Funktion allerdings durch die zwei überexprimierten Inhibitoren ABF1 (activated B-cell factor 1) und ID2 (inhibitor of differentiation and

DNA binding 2) beeinträchtigt (Mathas, Janz et al., 2006). Der TF EBF (early B cell factor), der gleichermaßen in der frühen Entwicklung für die Ausführung des B-Zell-Programms erforderlich ist, wird in HRS-Zellen ebenfalls nur gering exprimiert (Hertel, Zhou et al., 2002, Mathas, Janz et al., 2006). Im Mausexperiment aktiviert Ebf die Transkription von B-Zell-spezifischen Genen und unterdrückt die Expression von myeloischen und T-Zell-Genen, sodass die geringe Expression in HRS-Zellen für einen Teil der Veränderungen des Phänotyps verantwortlich sein kann (Pongubala, Northrup et al., 2008).

Das *PAX5*-Gen kodiert den TF BSAP (B-cell-specific activator protein), der in allen B-Zellen, ausgenommen die Plasmazellen, exprimiert wird (Barberis, Widenhorn et al., 1990, Adams, Dorfler et al., 1992). In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass Pax5 die Expression von B-Zell-spezifischen Genen aktiviert und Gene anderer hämatopoetischer Zellpopulationen unterdrückt (Nutt, Heavey et al., 1999). In HRS-Zellen findet jedoch nur eine schwache bis mittelmäßige Expression von BSAP statt (Foss, Reusch et al., 1999).

Auch die in der späten Entwicklung Einfluss nehmenden TF OCT2 und BOB1, die in B-Zellen an der Regulation der Transkription von Genen für Immunglobuline beteiligt sind, werden nicht bzw. nur sehr gering exprimiert. (Re, Muschen et al., 2001, Stein, Marafioti et al., 2001).

Der gleichermaßen in einer späten Phase wichtige TF NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) reguliert die Transkription verschiedener Zielgene, dazu gehören beim cHL unter anderem antiapoptotische Faktoren (Hinz, Lemke et al., 2002). Der NF- $\kappa$ B-Signalweg ist in den HRS-Zellen konstitutiv aktiviert und für die cHL-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von NF- $\kappa$ B die Proliferation und das Überleben der HRS-Zellen beeinträchtigt (Bargou, Leng et al., 1996, Bargou, Emmerich et al., 1997).

Des Weiteren wurden die beiden TF STAT5A und STAT5B (signal transducer and activator of transcription 5A und 5B) als potentielle Komponente des veränderten Phänotyps der HRS-Zellen identifiziert. STAT5A und STAT5B werden in den HRS-Zellen exprimiert und die Aktivierung von STAT5 hemmt über E47 die Expression von BCR (Scheeren, Diehl et al., 2008).

Neben der Tatsache, dass HRS-Zellen viele der typischen B-Zell-Marker nicht aufweisen, exprimieren sie Gene anderer Zelllinien. Notch1 ist Teil einer Familie von Transmembranrezeptoren, die Zellproliferation und -differenzierung im Zusammen-



hang mit extrazellulären Liganden, die auf benachbarten Zellen exprimiert werden, kontrollieren (Maillard, Fang et al., 2005). Im lymphatischen Gewebe von Mäusen hemmt Notch1 die B-Zell-Entwicklung und fördert die T-Zell-Entwicklung (Pui, Allman et al., 1999). NOTCH1 wird von HRS-Zellen stark exprimiert und reguliert dort die Expression der Transkriptionsfaktorgene *E2A* und *EBF* herunter, während die des *E2A*-Inhibitors ABF1 herauf reguliert wird (Jundt, Anagnostopoulos et al., 2002, Jundt, Acikgoz et al., 2008). Indirekt unterstützt NOTCH1 so den Verlust der B-Zell-Identität.

Ein weiterer in den HRS-Zellen überexprimierter B-Zell-Marker ist CSF1, auch bekannt als M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), der normalerweise in Makrophagen und Monozyten exprimiert wird und dort die Proliferation und Differenzierung reguliert (Pixley and Stanley, 2004, Hamilton, 2008). HRS-Zellen exprimieren sowohl CSF1 als auch den CSF1-Rezeptor (CSF1R), der die Funktionen von CSF1 vermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass das *CSF1R*-Gen aufgrund von deregulierten epigenetischen Mechanismen konstitutiv aktiviert ist und von den HRS-Zellen zum Überleben benötigt wird (Mathas, Janz et al., 2006, Lamprecht, Walter et al., 2010).

Ein weiterer Mechanismus, der den Verlust der B-Zell-Identität beeinflusst, ist die DNA-Methylierung. Einige B-Zell-spezifische Gene sind über diesen epigenetischen Mechanismus inaktiviert (Ushmorov, Leithauser et al., 2006). Ein Beispiel dafür ist das *B29*-Gen, welches ein BCR-Molekül kodiert, das Immunglobulin-Signale übermittelt, die für das Überleben von B-Zellen erforderlich sind (van Noesel and van Lier, 1993, Doerr, Malone et al., 2005). Die DNA-Methylierung kann dabei zum einen eine Inaktivierung *de novo* hervorrufen, zum anderen kann die Methylierung als Folge einer Herunterregulation vorgeschalteter Gene auftreten (Bird, 2002, Bachman, Park et al., 2003). Interessanterweise sind Gene, die beim cHL hypermethyliert sind, nicht aber bei anderen von den B-Zellen des Keimzentrums abstammenden Lymphomen, vor allem für Funktionen wie die Regulation von B- und T-Zell-Aktivierung verantwortlich (Ammerpohl, Haake et al., 2012).

Zusammenfassend zeigt sich, dass die B-Zell-Identität über verschiedene Pathomechanismen beeinflusst wird, dabei spielen insbesondere die TF eine große Rolle. Ein gemeinsamer auslösender Faktor dieser Veränderungen ist bisher jedoch nicht bekannt.

### **1.3 In dieser Arbeit untersuchte Transkriptionsfaktoren**

#### **1.3.1 *ETS1***

Das *ETS1* (v-ets avian erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1)-Gen kodiert den Transkriptionsfaktor ETS1, der zu den Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie gehört. Diese Proteinfamilie wird charakterisiert durch die Bindungsdomäne EBS (ETS binding site) ihrer Mitglieder, die an das DNA-Konsensusmotiv GGAA/T von Zielgenen bindet (Singh, Swarnalatha et al., 2011). Das Protein ETS1 ist auf Chromosom 11q24.3 kodiert und erstreckt sich von Position 127.833.870 bis 127.897.371 über eine Länge von 63.502 Bp (Basenpaare) (Human Genome March 2006 (NCBI36/hg18)). In Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Ets1 die Hämatopoese beeinflusst und eine Inaktivierung des Gens bei Mäusen zu einer gestörten B-Zell-Entwicklung führt (Barton, Muthusamy et al., 1998, Eyquem, Chemin et al., 2004). Darüber hinaus nimmt Ets1 im Mausexperiment Einfluss auf den Klassenwechsel bestimmter Isotypen von Immunglobulinen in B-Zellen und auf die Expression B-Zell-spezifischer Gene über Blimp-1 und das *Pax5*-Gen (Nutt, Heavey et al., 1999, John, Clements et al., 2008, Nguyen, Mouly et al., 2012).

Eine DNA-Methylierungsstudie konnte kürzlich den Nachweis erbringen, dass, im Vergleich mit normalen B-Zellen und anderen, dem Keimzentrum entstammenden B-Zell-Lymphomen, 209 Protein-kodierende Gene ausschließlich beim cHL hypermethyliert sind (Ammerpohl, Haake et al., 2012). Unter diesen Genen waren solche angereichert, die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren EBF1/OLF1 beziehungsweise E2A enthalten. Für beide TF wurde bereits gezeigt, dass sie die B-Zell-Entwicklung beeinflussen und beim cHL dereguliert sind (Kee, Quong et al., 2000, Hertel, Zhou et al., 2002, Mathas, Janz et al., 2006, Pongubala, Northrup et al., 2008). Die Bindung von Transkriptionsfaktoren kann den Methylierungsstatus ihrer Zielgene beeinflussen (Serandour, Avner et al., 2011). So kann es durch die Herunterregulation eines TF und die darauf folgende verminderte Transkription der Zielgene zu einer sekundären Hypermethylierung mit Gen-Silencing kommen (Novik, Nimmrich et al., 2002, Bachman, Park et al., 2003, Szyf, 2003, van Noesel, van Bezouw et al., 2003, Leu, Yan et al., 2004, Ushmorov, Leithauser et al., 2006). Zudem konnte in der DNA-Methylierungsstudie von Ammerpohl et al. gezeigt werden, dass Gene mit Bindungsstellen für den TF *ETS1* signifikant unter den methylierten Genen angereichert waren. Dabei zeigten diese Gene die drittstärkste Anreicherung, was vermuten lässt, dass auch dieser TF beim cHL dereguliert ist

(Ammerpohl, Haake et al., 2012). Die Methylierungsstudie zeigte jedoch auch, dass das *ETS1*-Gen selbst nicht hypermethyliert und auf diesem Weg inaktiviert ist. Die Analyse von bereits publizierten Genexpressionsdaten von Küppers et. al dokumentiert allerdings die 7,23-fach verringerte Expression von *ETS1*-mRNA in den cHL-Zelllinien gegenüber normalen B-Zellen (Abb. 4) (Küppers, Klein et al., 2003, Overbeck, Martin-Subero et al., 2012). Zur Ursache dieser beobachteten verminderten Expression gibt es bisher keine Erkenntnisse.

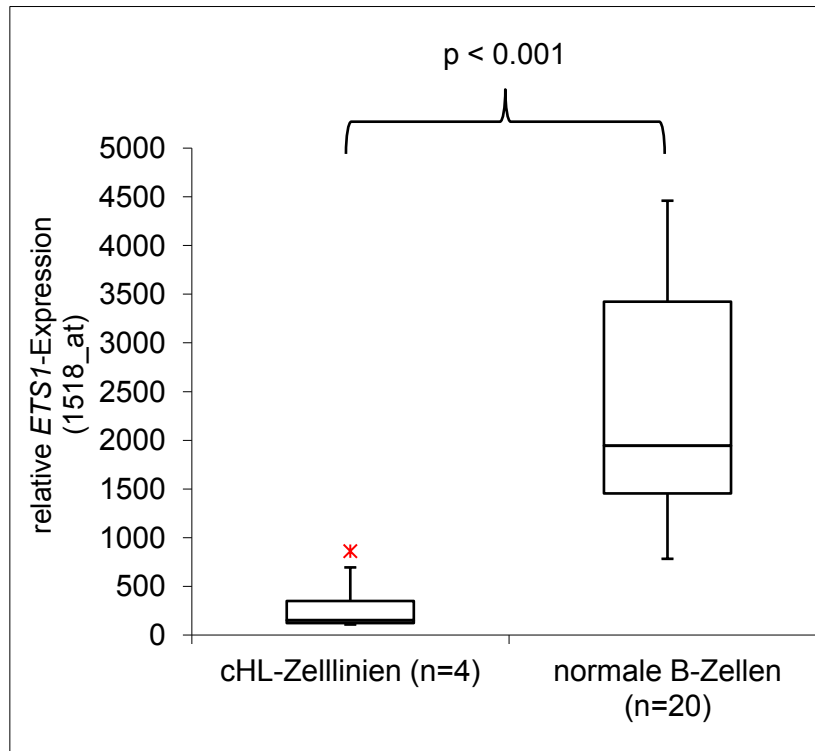


Abb. 4 Signifikant verringerte Expression von *ETS1* in den cHL-Zelllinien im Vergleich zu normalen B-Zellen (5 x Zentroblasten, 5 x Zentrozyten, 5 x naive B-Zellen, 5 x B-Gedächtniszellen) (Overbeck, Martin-Subero et al., 2012)

Aufgrund der Bedeutung von *ETS1* für die B-Zell-Entwicklung und der bisherigen Erkenntnisse, stellt sich die Frage, ob das *ETS1*-Gen in primären cHL-Fällen inaktiviert ist und so einen Beitrag zum Verlust der B-Zell-Identität leistet.

### 1.3.2 *BCOR* und *BCORL1*

Die beiden transkriptionellen Co-Repressoren *BCOR* (BCL6 corepressor) und *BCORL1* (BCL6 corepressor-like 1) sind homologe Gene. *BCOR* ist auf Chromosom Xp11.4 kodiert und erstreckt sich von Position 39.795.443 bis 39.841.663 über 46.221 Basenpaare. *BCORL1* ist auf Chromosom Xq26.1 kodiert und reicht von Position 128.944.350 bis 129.019.282 über eine Länge von 74.933 Basenpaaren (Human Genome March 2006 (NCBI36/hg18)).

*BCOR* wird in diversen menschlichen Geweben exprimiert und wirkt als ein Co-Repressor von *BCL6* (Huynh, Fischle et al., 2000). Das *BCL6*-Gen ist ein Protoonkogen und kodiert einen transkriptionellen Repressor, der sequenzspezifisch ist und in den B-Zellen des Keimzentrums stark exprimiert wird (Chang, Ye et al., 1996). *Bcl6* ist in Mäusen nachweislich für die Entstehung von Keimzentren notwendig und reguliert dort über die Expression verschiedener B-Zell-spezifischer Gene die terminale B-Zell-Differenzierung (Dent, Shaffer et al., 1997, Shaffer, Yu et al., 2000). Auch die Apoptose wird von *BCL6* beeinflusst (Baron, Anastasi et al., 2002). *Bcl6* unterdrückt unter anderem die Expression des Tumorsuppressorgens *tp53* und nimmt so Einfluss auf die *tp53*-vermittelte Apoptose bei DNA-Schäden der B-Zellen des Keimzentrums (Phan and Dalla-Favera, 2004). Zudem kann *Bcl6* die Expression des TF *Nf-kb1* unterdrücken und so *Nf-kb*-vermittelte zelluläre Funktionen hemmen (Li, Wang et al., 2005). Translokationen von *BCL6* lassen sich vielfach in den malignen Zellen des NLPHL nachweisen, aber nur selten in den HRS-Zellen des cHL (Wlodarska, Nooyen et al., 2003, Martin-Subero, Klapper et al., 2006).

Bisher nicht publizierte Daten von Giefing et al. weisen in vier von sieben cHL-Zelllinien Veränderungen von *BCOR* nach. Bei der Zelllinie UHO1 handelt es sich dabei um eine homozygote Deletion, bei den Zelllinien HDLM2, KMH2, L540 liegen inaktivierende Mutationen vor. Außerdem scheint *BCOR* eine wichtige Rolle in der frühen Embryonalentwicklung und für die Funktion von mesenchymalen Stammzellen zu spielen (Wamstad and Bardwell, 2007, Wamstad, Corcoran et al., 2008, Fan, Yamaza et al., 2009). Die unveröffentlichte Analyse von mRNA-Expressionsdaten von Brune et al. von 2008 zeigt, dass *BCOR* in der untersuchten Gruppen aus Zelllinien und Primärmaterial auf einem geringeren Level exprimiert wird als in der Kontrollgruppe von normalen B-Zellen (Abb. 5).

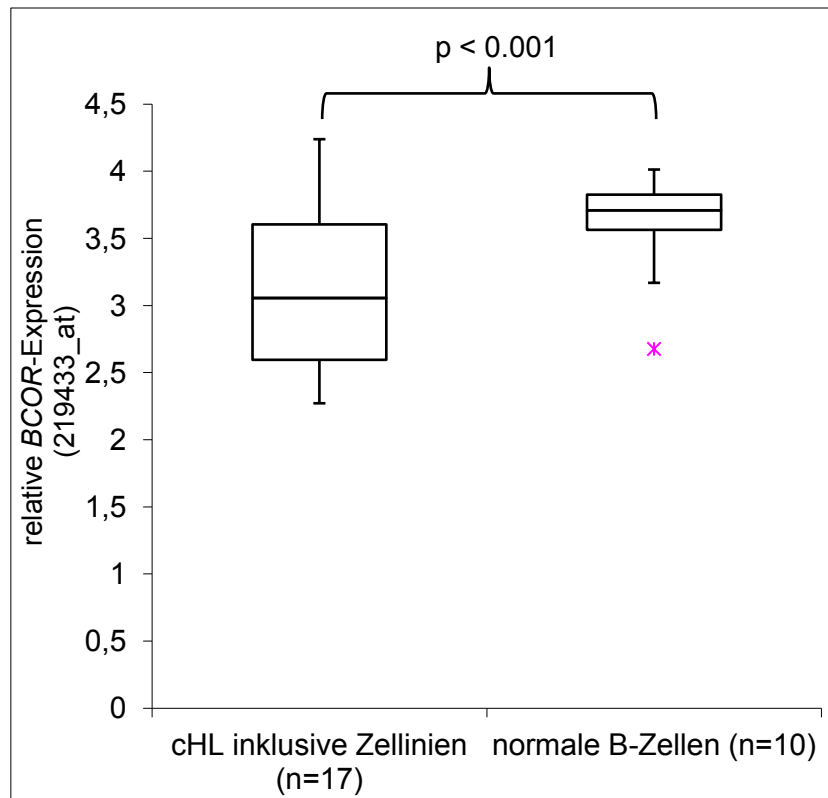


Abb. 5 Verringerte Expression von BCOR in cHL-Zelllinien und Primärmaterial im Vergleich zu normalen B-Zellen (Daten von Brune et al., 2008)

*BCORL1* wird ebenfalls in diversen Geweben exprimiert, besonders hoch in der Prostata und in den Hoden. Trotz der großen Homologie des *BCOR*-Gens und *BCORL1*-Gens agiert *BCORL1* allerdings nicht als Co-Repressor von BCL6. Funktionsanalysen haben gezeigt, dass *BCORL1* an bestimmte Klasse II-Histon-Deacetylasen binden kann, außerdem mit dem CtBP (C-terminal binding protein) Co-Repressor interagiert und die Repression von E-Cadherin beeinflusst (Pagan, Arnold et al., 2007).

Aufgrund der beschriebenen Funktionen und der unveröffentlichten *BCOR*-Daten liegt die Frage nahe, ob die Transkriptionsfaktorgene *BCOR* und sein Homolog *BCORL1* in primären Fällen des cHL inaktiviert sind und damit Einfluss auf die Pathogenese des cHL nehmen.

#### 1.4 Ziele dieser Arbeit

Bisher konnten durch diverse Studien einige Komponenten identifiziert werden, die zu einem Verlust der B-Zell-Identität der Hodgkin- und Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms beitragen. In diesem Zusammenhang wird vor allem die Bedeutung von Transkriptionsfaktoren deutlich.

Auf der Basis der beschriebenen Studienlage zu den Transkriptionsfaktoren ETS1, BCOR und BCORL1 wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Verlust der zugehörigen TF-Gene einen relevanten Einfluss auf die Pathogenese des cHL nehmen könnte. Es ist daher von Bedeutung, mögliche zugrundeliegende Mechanismen zu identifizieren und den Nachweis des Verlusts dieser Transkriptionsfaktoren in primären HRS-Zellen zu erbringen.

Die Ziele dieser Arbeit waren:

- 1) Identifikation von chromosomalen Imbalancen (Deletionen) in primären cHL-Fällen am Genort des Transkriptionsfaktors ETS1 auf Chromosom 11,
- 2) Identifikation von chromosomalen Imbalancen (Deletionen) in primären cHL-Fällen an Genorten der beiden homologen transkriptionellen Co-Repressoren BCOR und BCORL1 auf Chromosom X.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Gewebeproben**

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphknotenkryoschnitte von 21 Patienten, bei denen ein klassisches Hodgkin-Lymphom diagnostiziert worden war, analysiert. Die Kryoschnitte wurden von Prof. Dr. Wolfram Klapper, Leitung der Sektion für Hämatopathologie vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, zur Verfügung gestellt. Dies geschah auf der Grundlage des Votums der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel vom 16.08.2010 (D447/10), welches die anonymisierte Verwendung des eingeschickten Materials an das Lymphknotenregister des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, nach Abschluss der Diagnostik erlaubt. Die auf Seite 17 folgende Tabelle 2 enthält Informationen über die Patienten und Merkmale der untersuchten Materialien.

Zusätzlich zu den Kryoschnitten wurde Material von sieben cHL-Zelllinien untersucht. Diese wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) bezogen sowie von Prof. Dr. phil. nat. Andreas Bräuninger vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen, ehemals Universitätsklinikum Münster, zur Verfügung gestellt (L540, UHO1).

Tab. 1 Übersicht über die cHL-Zelllinien

Zelllinie	Subtyp	Ploidiegrad
L428	nodulär-sklerosierend	4
HDLM2	nodulär-sklerosierend	2
KMH2	gemischtzellig/lymphozytenarm	3
L1236	gemischtzellig	3
SUPHD1	nodulär-sklerosierend/lymphozytenarm	2
UHO1	nodulär-sklerosierend	2
L540	nodulär-sklerosierend	2-3

Tab. 2 Übersicht über die Kryoschnitte (f = feminin, m = maskulin)

Nummer	Subtyp cHL	Geschlecht	Ploidiegrad
1	lymphozytenarm	m	3 oder 4
2	nodulär-sklerosierend	m	2 oder 4
3	nodulär-sklerosierend	m	3
4	gemischtzellig	w	2 oder 4
5	gemischtzellig	w	3 oder 4
6	lymphozytenarm	m	2 oder 3
7	nodulär-sklerosierend	m	2 oder 3
8	gemischtzellig	m	2
9	gemischtzellig	m	2 oder 3
10	gemischtzellig	w	3 oder 4
11	nodulär-sklerosierend	m	3 oder 4
12	gemischtzellig	m	2, 3 oder 4
13	nodulär-sklerosierend	w	2 oder 4
14	gemischtzellig	w	2 oder 3
15	gemischtzellig	w	4 oder 5
16	gemischtzellig	m	2
17	gemischtzellig	m	2
18	nodulär-sklerosierend	w	3
19	gemischtzellig	m	3
20	nodulär-sklerosierend	m	4 bis 7
21	gemischtzellig	m	4

Der Ploidiegrad der untersuchten Fälle wurde anhand der mittleren Signalanzahl für die Centromerproben CEP6, CEP10 (unveröffentlichte Daten), CEP16 und CEP17 abgeschätzt (Schmitz, Hansmann et al., 2009, Lamprecht, Walter et al., 2010, Otto, Giefing et al., 2012).



### 2.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien sowie deren Bezugsort.

Tab. 3 Übersicht über die verwendeten Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Amicon Microcon-Filter	Merck Millipore, Schwalbach, Deutschland
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Cot-1-DNA, humane (1µg/µl)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
DABCO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
DAPI-Stammlösung (4' G-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
dATP, dCTP, dGTP, dTTP (100mM)	Enzo Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Dextransulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
dUTP – Spektrum green (1mM)	Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland
dUTP – Spektrum orange (1mM)	Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland
Eisessig (Eisessig 100 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fixogum Rubber Cement	Marabu GmbH und Co. KG, Tamm, Deutschland
Formamide	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Glycerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Igepal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
LB Broth Base	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Nestlé Deutschland AG, Frankfurt, Deutschland
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·xH <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Natriumacetat-Trihydrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

In der folgenden Tabelle sind die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sowie deren Herstellungsverfahren aufgeführt.

Tab. 4 Übersicht über die verwendeten Puffer und Lösungen

Antifade	10 ml PN-Puffer, der 23 mg/ml DABCO enthält, und 90 ml Glycerin wurden zusammengefügt und lichtgeschützt bei 4°C gelagert.
Carnoy's Fixativ	Methanol und Eisessig im Verhältnis von 3:1
DAPI-Lösung	20 µl DAPI-Stammlösung (0,2 mg/ml DAPI in Aqua dest.) mit 60 ml 2xSSC, lichtgeschützte Lagerung.
LB-Medium	20 g LB Broth Base wurden mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt, darin gelöst, im Anschluss autoklaviert und bei 4°C gelagert. Zur Verwendung erfolgte die Beimischung von 500 µl Chloramphenicol.
Mastermix 50 %	2,5 ml deionisiertes Formamide, 1,25 ml 40 %iges Dextransulfat, 0,5 ml 20xSSC und 0,25 ml Aqua dest. wurden gemischt. Der pH wurde auf 7,5 eingestellt und die Lösung bei -20°C eingefroren.
Natriumacetat-Lösung, 3-molar, pH 5,3	40,82 g Natriumacetat-Trihydrat wurden in 80 ml Aqua dest. gelöst, der pH mit NaOH auf 5,3 eingestellt und mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
Paraformaldehydlösung (1 %)	10 g Paraformaldehyd wurden in 1000 ml Aqua dest. auf der Heizplatte erwärmt, bis alles gelöst war. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

PN-Puffer	13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 17,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ wurden in 800 ml Aqua dest. gelöst, der pH-Wert auf 8,0 eingestellt und die Lösung mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt.
PNM-Puffer	50 g Magermilchpulver und 0,2 g Natriumazid wurden auf 1000 ml mit PN-Puffer aufgefüllt, für ein bis zwei Stunden auf 50°C erhitzt und 15 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert. Der gewonnene Überstand ergab den PNM-Puffer, welcher bei 4°C etwa ein Jahr haltbar ist.
20x SSC-Lösung	175,3 g NaCl und 88,2 g Natriumcitrat wurden mit Aqua dest. auf 800 ml aufgefüllt, der pH auf 7,0 eingestellt und mit Aqua dest. auf ein Volumen von 1000 ml aufgefüllt. Die Verdünnung dieser 20x SSC-Lösung mit Aqua dest. in einem Verhältnis von 1:10 ergab die entsprechende 2x SSC-Lösung.
Waschpuffer I	2 ml 20x SSC-Lösung und 300 µl Igepal wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.
Waschpuffer II	10 ml 20x SSC-Lösung und 100 µl Igepal wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

#### 2.1.4 Kits

Die folgenden Kits wurden in der vorliegenden Arbeit verwendet:

Tab. 5 Übersicht über die verwendeten Kits

BioPrime DNA Labeling Kit	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
PhasePrep™ BAC DNA Kit	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

#### 2.1.5 Geräte und Ausrüstung

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die verwendeten Geräte und weitere Ausrüstung sowie deren Hersteller.

Tab. 6 Übersicht über die verwendeten Geräte, Ausrüstung und Software

automatisches Aufarbeitungsgerät für FISH-Protokolle	VP 2000 Processor	Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland
Brutschrank	Heraeus B5025	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Filtersätze Fluoreszenzmikroskope	Filterhalterungen und Filtersätze	AHF Analysentechnik AG, Tübingen, Deutschland

Fluoreszenzmikroskope	Axioskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, Deutschland
	AXIO Imager.A1	
	Axioplan	
Mikroskopkamera	MetaSystems IMAC-CCD S30	MetaSystems GmbH, Altlussheim, Deutschland
Objektträgerhalter	Shandon-Objektträgerhalter	Shandon GmbH, Frankfurt, Deutschland
Spektralphotometer	NanoDrop ND-1000 Spectrometer	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Wasserbad	Köttermann 3042	Köttermann GmbH und Co. KG, Uetze/Hänigsen, Deutschland
Zentrifugen	Heraeus Biofuge 22R	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
	Mikro 200	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
	Super T21	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
	Universal 16	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
FISH-Dokumentation	ISIS Imaging System	MetaSystems GmbH, Altlussheim, Deutschland
Messung der DNA-Konzentration	NanoDrop Software	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland

## 2.1.6 Antikörper für FICTION

Die folgenden Antikörper wurden in der hier vorliegenden Arbeit verwendet:

Tab. 7 Übersicht über die verwendeten Antikörper

Anti-CD30 (Ber-H2)	Primärantikörper	monoklonaler Maus-anti-human-Antikörper	Sektion für Hämatopathologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, Deutschland
Alexa Fluor® 594	Sekundärantikörper	Kaninchen-anti-Maus-IgG (H+L)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

## 2.1.7 DNA-Sonden für FICTION

### 2.1.7.1 Kommerziell erhältliche FISH-Sonden

Zur Markierung des in der vorliegenden Arbeit relevanten Chromosoms 11 und des X-Chromosoms wurden in beiden Fällen Centromersonden (CEP11, CEPX, markiert

in Spectrum Aqua) der Firma Abbott GmbH & Company KG, Wiesbaden, Deutschland verwendet.

### 2.1.7.2 Selbst hergestellte FISH-Sonden

Für die Untersuchung der Genorte der Transkriptionsfaktoren ETS1, BCOR und BCORL1 wurde jeweils eine entsprechende FISH-Sonde aus BAC (bacterial artificial chromosome)-Klonen hergestellt und markiert. Die BAC-Klone wurden von Life Technologies GmbH (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Die Lokalisation der zu untersuchenden Gene sowie die Lokalisation der Sonden sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

Tab. 8 selbst hergestellte, verwendete DNA-Sonden (SG: Spectrum Green, SO: Spectrum Orange)

Gen	Chromosom	Lokalisation des Gens (NCBI36/hg18)	Klon	Position der Sonde (NCBI36/hg18)	Farbe
<i>ETS1</i>	11q24.3	127,833,870-127,897,371	RP11-629A20	127,829,716-128,013,769	SO
<i>BCOR</i>	Xp11.4	39,795,443-39,841,663	CTD-2591N21	39,796,393-39,963,634	SG
<i>BCORL1</i>	Xq25	128,944,350-129,019,282	RP11-1081P9	128,884,380-129,047,670	SO

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Angewendete molekularzytogenetische Verfahren zur Untersuchung des Hodgkin-Lymphoms**

Die hier angewendeten Verfahren wurden auf der Grundlage der Standardarbeitsanweisungen des Instituts für Humangenetik vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel durchgeführt und sind nachfolgend beschrieben.

#### **2.2.1.1 Prinzip der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)**

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist eine Methode, die der farblich markierten Darstellung von ausgesuchten Chromosomenabschnitten oder Chromosomen dient. Grundlage für dieses Verfahren ist die komplementäre Basenpaarung von zwei Nukleinsäuresträngen. Dabei wird unterschieden zwischen:

- der Ziel-DNA, die in Form von Interphase-Zellkernen oder Metaphase-Chromosomen vorliegt und
- der DNA-Probe, die komplementär zur Ziel-DNA und mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert ist, der den Nachweis der Hybridisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop ermöglicht.

Nach der notwendigen Vorbereitung und Denaturierung des Untersuchungsmaterials wird dieses mit der gewünschten DNA-Probe hybridisiert. Im Anschluss kann das Untersuchungsmaterial im Fluoreszenzmikroskop mit Hilfe der entsprechenden Farbfilter ausgewertet werden (Cremer, Landegent et al., 1986, Knippers, 2006).

#### **2.2.1.2 Prinzip der kombinierten Immunphänotypisierung und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FICTION)**

Die FICTION (Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasia)-Methode ist die Kombination der FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) mit einer gezielten Immunphänotypisierung. Die Immunphänotypisierung identifiziert dabei zelluläre Antigene und die FISH-Methode gezielt chromosomale Veränderungen (Weber-Matthiesen, Winkemann et al., 1992). Diese Kombination von FISH mit der immunologischen Markierung einer Subpopulation von Zellen erlaubt z.B. die Identifizierung minimaler Resterkrankung (MRD) oder der malignen HRS-Zellen (Weber-Matthiesen, Deerberg et al., 1995, Martin-Subero, Chudoba et al., 2002).

### **2.2.2 Präparation von BAC-DNA**

BAC-haltige *E. coli*-Klone wurden über Nacht in 250 ml LB-Medium, versetzt mit Chloramphenicol, bei 37 °C im Schüttelinkubator angezüchtet. Die DNA wurde mit Hilfe des PhasePrep™ BAC DNA Kit von SIGMA nach Anleitung des Herstellers extrahiert und in 100 µl Aqua dest. resuspendiert.

### **2.2.3 DNA-Quantifizierung**

Die Konzentrationsbestimmung wurde mit dem NanoDrop ND-1000 durchgeführt. Dieses Spektrophotometer misst die Konzentration von Lösungen anhand ihrer optischen Dichte bei 260 nm und 280 nm. Die Berechnung erfolgte unter der Annahme, dass doppelsträngige DNA in einer Konzentration von 50 µg/ml bei einer optischen Dichte von 1 vorliegt.

Als Qualitätskontrolle wurde die Reinheit der Nukleinsäuren durch das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm berechnet und durch einen Wert zwischen 1,8 und 2 bestätigt.

### **2.2.4 Vorbereitung der Nukleotidmischung für die DNA-Markierung**

Zur Vorbereitung der DNA-Markierung wurden dNTP-Mischungen mit den entsprechenden Markierungsfarben Spectrum Green (SG) und Spectrum Orange (SO) hergestellt. Dafür wurden 2,5 µl dATP (10mM), 2,5 µl dCTP (10mM), 2,5 µl dGTP (10mM), 1,25 µl dTTP (10mM), 12,5 µl dUTP (SG oder SO) sowie 3,75 µl Aqua dest. zusammengegeben, sodass 25 µl gebrauchsfertige Lösung entstand.

### **2.2.5 Markierung der DNA-Proben**

Die Markierung der DNA-Proben erfolgte mittels Random-Primer und dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I aus *E. coli*. Diese Methode beruht auf der Anlagerung von zufällig generierten Oligonukleotiden, die die Funktion eines Primers übernehmen, an die zuvor denaturierten DNA-Proben. Im Anschluss synthetisiert das Klenow-Fragment den Komplementärstrang und baut dabei die fluoreszenzmarkierten Nukleotide ein.

Unter Anwendung des BioPrime DNA Labeling System wurde die Markierung folgendermaßen durchgeführt: 1 µg jeder BAC-DNA wurde mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24 µl verdünnt. Nach Zugabe von 20 µl 2,5x Random Primer erfolgte eine Hitzedenaturierung in kochendem Wasser für 5 min und eine sofortige Abkühlung auf Eis. Anschließend wurden 5 µl der farblich markierten dNTP-Mischung

(SG bzw. SO) und dann 1 µl Klenow-Fragment untergemischt und kurz anzentrifugiert. Nach der Inkubation über Nacht bei 37 °C wurden 5 µl Stop Puffer hinzugegeben.

### **2.2.6 Reinigung der markierten DNA-Proben**

Die Aufreinigung erfolgte mit Amicon Microcon-Filter. Die markierte DNA wurde zusammen mit 300 µl Wasser auf die Säule gegeben und für 10 min bei 13.000 g zentrifugiert. Nach Entfernung des Durchflusses erfolgte erneut die Zugabe von 300 µl Wasser und 10 min Zentrifugation bei 13.000 g. Im Anschluss wurde 5 µl Wasser auf die Säule pipettiert, diese umgekehrt in ein neues Röhrchen gegeben und erneut 5 min bei 1.700 g zentrifugiert. Die aufgereinigte DNA wurde zurück in das ursprünglich etikettierte Eppendorf-Röhrchen gegeben und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.7 Vorbereitung der DNA-Sonden**

5 µl Cot-1-DNA wurden mit 10 µl je markierter BAC-DNA gemischt, 1/10 Volumen 3-molarer Natriumacetat-Lösung und das 2,5fache der Gesamtmenge an absolutem Ethanol hinzugefügt. Die hochrepetitive unmarkierte menschliche Cot-1-DNA dient dem sogenannten Preannealing. Dabei bindet die Cot-1-DNA an im menschlichen Genom ubiquitär vorkommende repetitive Abschnitte und verhindert so, dass diese in der nachfolgenden FISH-Analyse unspezifische Signale erzeugen können. Nach einer 30minütigen Zentrifugation bei 15.000 g wurde der Überstand entfernt und das Pellet im Dunkeln zum Schutz der Fluoreszenzfarbstoffe getrocknet. Unter Zugabe von 10 µl 50 % Mastermix pro 10 µl markierter BAC-DNA, sowie 1 µl Centromerprobe je 10 µl Mastermix wurde die Sonde in einer Stunde im Schüttler bei 37 °C wieder gelöst.

### **2.2.8 Anwendung der FICTION-Methode**

Die Shandon-Objektträgerhalter wurden zur Erleichterung des Ablaufs verwendet. Mit dieser Vorrichtung kann ein Volumen von 100 µl Flüssigkeit in Kontakt mit dem Objektträger gebracht werden. Dafür wurden die Objektträger mit der zu hybridisierenden Seite unter Zugabe von PN-Puffer in Kontakt mit der Plastikhalterung gebracht und in dem dazugehörigen Shandonständer fixiert. Wie in Abb. 6 sichtbar, kann dann die entsprechende Flüssigkeit über eine trichterartige Öffnung hinzugegeben werden und läuft zwischen dem Objektträger und der Halterung durch. Aufgrund der Wirkung von Kapillarkräften verbleiben 100 µl zwischen den beiden Oberflächen.



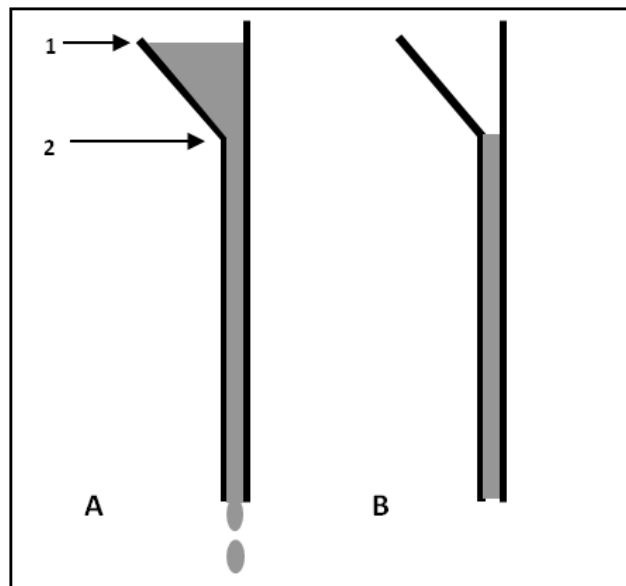


Abb. 6 Schema der Shandonständer (Martin-Subero, 2001)

#### 2.2.8.1 CD30-Immunphänotypisierung

Die Objektträger wurden aufgetaut und mindestens 30 min luftgetrocknet. Nach der Fixierung in Aceton für 10 min bei Raumtemperatur wurden die Objektträger erneut luftgetrocknet und unter Gebrauch von PN-Puffer an die Shandonhalterung angebracht und anschließend im Shandonständer fixiert. Zur Überprüfung der ordnungsgemäßen Fixierung wurde PN-Puffer in die obere Öffnung gegeben und durchlaufen gelassen.

Es erfolgte die Zugabe von 100 µl des gelösten primären monoklonalen Anti-CD30-Antikörpers, der 1:5 in PNM-Puffer verdünnt war, und eine 30minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Zur Abdunkelung wurde ein lichtundurchlässiger Deckel auf den Ständer gesetzt. Während des gesamten weiteren Vorgangs ist die Dunkelheit von entscheidender Bedeutung, um das Ausbleichen der Präparate bzw. des fluoreszenzmarkierten Immunphänotyps zu verhindern.

Zum Waschen wurde PN-Puffer in den Trichter gegeben, im Anschluss 100 µl des Alexa594-konjugierten Kaninchen-anti-Maus-Antikörpers (1:50 in PNM-Puffer) hinzugefügt und erneut 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit PN-Puffer wurden die Objektträger aus dem Shandonständer und der Halterung entfernt und in eine Küvette mit PN-Puffer gestellt.

Zur Fixation wurden die Objektträger für 10 min in eine Küvette mit eiskaltem Carnoy's Fixativ (Methanol : Eisessig 3 : 1) gestellt. Im weiteren Verlauf wurden die Objektträger für eine Minute in destilliertem Wasser gewaschen, 1 min in 1 %iger

Paraformaldehydlösung fixiert und wieder 1 min in destilliertem Wasser gewaschen. Nach der Dehydrierung der fixierten Zellen für je 2 min der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 % und absolut) wurden die Objektträger im Dunklen getrocknet.

#### **2.2.8.2 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung**

Im Anschluss an die immunologische Markierung erfolgte die Anwendung der zuvor hergestellten DNA-Sonden sowie kommerziell erhältlicher Centromerproben für die entsprechenden Chromosomen. 1,3 µl Sondenmix wurden auf das zuvor markierte Hybridisierungsfeld gegeben und mit einem Deckglas (Durchmesser 10 mm) bedeckt. Mit Fixogum wurde der Rand luftdicht verschlossen und die Objektträger in eine feuchte Metallkiste mit Deckel gelegt. Es folgte die Denaturierung der DNA in der Metallkiste im erhitzten Wasserbad bei 75 °C für 7 min und die Hybridisierung im Brutschrank bei 37 °C über Nacht oder über das Wochenende. Danach wurden die Objektträger nach Entfernung des Fixogums und des Deckglases im Routine-Waschprogramm des VP2000 Processors von Abbott gewaschen. Dabei wurde zunächst der Waschpuffer 1 auf 75 °C  $\pm$  1 °C erhitzt und die Objektträger für 2 min in diesen eingetaucht. Darauf folgte bei Raumtemperatur 1 min in Waschpuffer 2, 1 min in 2x SSC-Lösung, 5 min in DAPI und erneut 2x SSC-Lösung als Schutz vor dem Austrocknen bis zum Eindecken. Dazu wurden die Objektträger mit zwei Tropfen Antifade und einem Deckglas bedeckt.

#### **2.2.8.3 Auswertung der FICTION-Präparate**

Die Objektträger wurden mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops ausgewertet, welches mit den geeigneten Fluoreszenzfiltern ausgestattet war. Die Dokumentation erfolgte mit dem ISIS Imaging System.

Folgende Kriterien wurden bei der Auswertung der FICTION-Präparate angewendet:

1. Immunphänotyp: Die HRS-Zellen zeigen sich durch den Anti-CD30-Antikörper rot fluoreszierend, die umgebenden, nicht neoplastischen Zellen des Begleitinfiltrats sind hingegen CD30-negativ und fluoreszieren daher nicht rot.
2. Zellmorphologie: Die neoplastischen HRS-Zellen wurden anhand ihrer Größe und Form von dem Begleitinfiltrat abgegrenzt.

Bei der Auswertung wurden unter Berücksichtigung der Zellmorphologie mindestens fünf CD30-positive Zellen ausgezählt, wenn möglich bis zu 20. Zur Hybridisierungs-

kontrolle erfolgte die Auszählung und Auswertung von 50 CD30-negativen Zellen. Die Sichtung der Präparate erfolgte durch zwei unabhängige Auswerter.

Der Schwellenwert für eine Deletion bzw. für einen Zugewinn des jeweiligen Gens wurde auf 30 % festgelegt. Diese hohe Nachweisgrenze trägt einer häufig auftretenden Polyploidie der HRS-Zellen Rechnung und wurde daher wie bereits in anderen Studien angewendet (Schmidt, Schmitz et al., 2010, Otto, Giefing et al., 2012, Giefing, Winoto-Morbach et al., 2013).

Für *ETS1* und den Nachweis einer Deletion musste die Anzahl der vorhandenen *ETS1*-Signale in mindestens 30 % der Zellen eines Falls niedriger als der Ploidiegrad sein. In der Umkehr musste die Anzahl der *ETS1*-Signale zum Nachweis eines Zugewinns in mindestens 30 % der Zellen eines Falls höher sein als der Ploidiegrad. Fälle, bei denen die Auswertung der Signale in Bezug zum Ploidiegrad beider Auswerter übereinstimmend eine Deletion zeigte, wurden immer als Deletion gewertet.

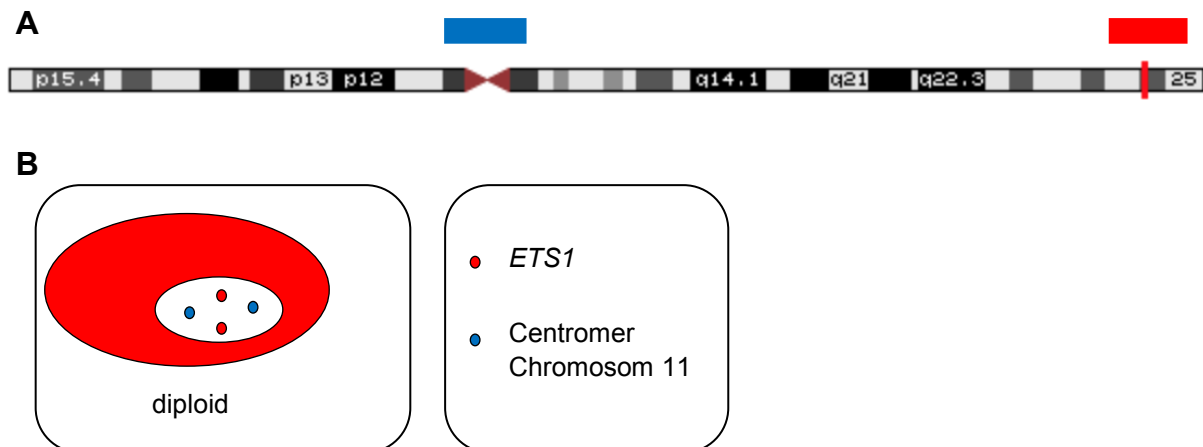
In einigen Fällen ließ sich der Ploidiegrad nicht eindeutig bestimmen, sodass in Tabelle 1 auf Seite 16 und Tabelle 2 auf Seite 17 mehrere Möglichkeiten angegeben sind. Bei der Analyse der Signale bezogen auf den Ploidiegrad orientierte sich diese stets an dem niedrigsten angegebenen Wert. Die Auswertung in Bezug zum Ploidiegrad fand dementsprechend anhand streng ausgelegter Kriterien statt. Daher wurde bei Fällen, bei denen die Auswertung in Bezug zum Ploidiegrad nur bei einem der beiden Auswerter eine Deletion zeigte, ein weiteres Kriterium herangezogen. Ergab die Analyse in diesen Fällen im Vergleich mit den Signalen der Centromerprobe bei beiden Auswertern übereinstimmend eine Deletion, so wurde der entsprechende Fall in der Zusammenschau ebenfalls als Deletion gewertet.

Eine auffällige Signalkonstellation bezogen auf die Centromerprobe bei beiden Auswertern bei jedoch übereinstimmend unauffälliger Analyse der Signale in Bezug zum Ploidiegrad war nicht ausreichend für die Bewertung als Deletion.

Bei der Untersuchung der auf dem X-Chromosom kodierten TF-Gene *BCOR* und *BCORL1* erfolgte die Auswertung dieser Bedingungen unter Berücksichtigung des Geschlechts der Patienten.

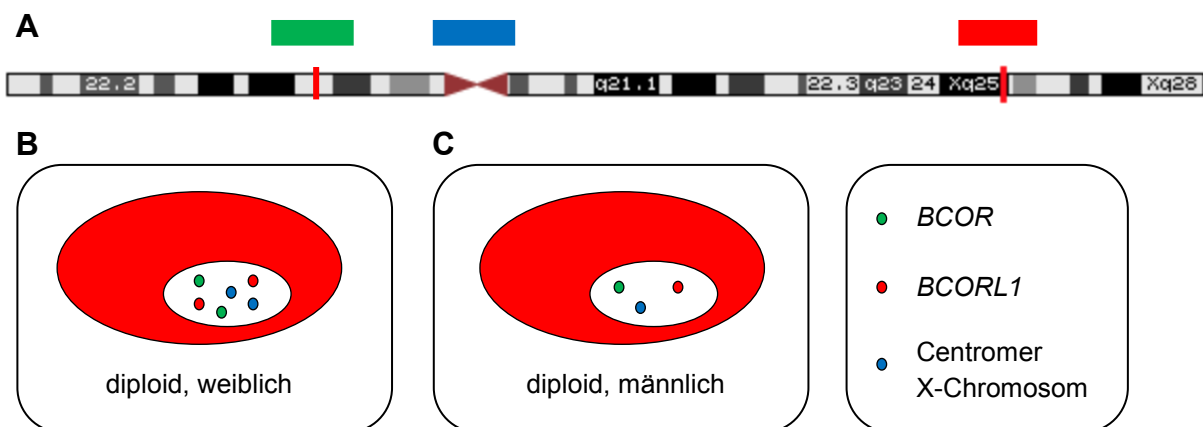
#### 2.2.8.4 *ETS1*-Signalkonstellation

Abb. 7 A: Schematische Darstellung der verwendeten FISH-Sonden für *ETS1*. Chromosom 11, rot – *ETS1*-Sonde, blau – Centromerprobe Chromosom 11. B: Beispielhafte schematische Darstellung normaler Signalkonstellation unter Anwendung der beschriebenen FICTION-Methode zur Untersuchung von *ETS1* bei einem diploiden Chromosomensatz. Rot eingefärbt die CD30-positive Zelle. Bei diploidem weiblichem oder männlichem Chromosomensatz sind je zwei blaue und rote Signale sichtbar.



#### 2.2.8.5 *BCOR*- und *BCORL1*-Signalkonstellation

Abb. 8 A: Schematische Darstellung der verwendeten FISH-Sonden für *BCOR* und *BCORL1*. X-Chromosom, grün – *BCOR*-Sonde, rot – *BCORL1*-Sonde, blau – Centromerprobe X-Chromosom. B, C: Beispielhafte schematische Darstellung normaler Signalkonstellationen unter Anwendung der beschriebenen FICTION-Methode zur Untersuchung von *BCOR* und *BCORL1* bei einem diploiden Chromosomensatz. Rot eingefärbt die CD30-positive Zelle. B: Bei diploidem, weiblichem Chromosomensatz sind je zwei grüne, rote und blaue Signale sichtbar. C: Bei diploidem, männlichem Chromosomensatz sind je ein grünes, rotes und blaues Signal sichtbar.



### **3 Ergebnisse**

Der Verlust der B-Zell-Identität der HRS-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms kann zum Teil durch die bereits bekannt veränderte Expression von Transkriptionsfaktoren erklärt werden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Häufigkeit von Deletionen an Genorten der TF ETS1, BCOR und BCORL1 mittels FICTION und damit deren möglichen Einfluss auf den Verlust der B-Zell-Identität zu analysieren.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den folgenden Kapiteln dargelegt. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Ergebnisse findet sich im Anhang von Seite 54 bis 103 in den Tabellen A1 bis A6. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden in diesem Kapitel nur die wesentlichen Ergebnisse dargelegt.

#### **3.1 Nachweis von *ETS1*-Deletionen**

Zum Nachweis von *ETS1*-Deletionen wurde die FICTION-Technik angewendet. Insgesamt wurden 21 primäre cHL-Fälle sowie sieben Zelllinien, zusammengefasst 28 Proben, untersucht. Die Auswertung war in 82 % erfolgreich (sechzehn primäre Fälle, sieben Zelllinien).

In Tabelle 9 auf der nachfolgenden Seite sind die Ergebnisse aus dieser Untersuchung zusammengefasst.

##### **3.1.1 *ETS1*-Deletionen bei cHL-Zelllinien**

Bei zwei der sieben untersuchten Zelllinien konnte eine *ETS1*-Deletion nachgewiesen werden. Das entspricht einem Prozentsatz von 29 %. Tabelle A1 im Anhang zeigt die detaillierten Ergebnisse dieser Fälle.

##### **3.1.2 *ETS1*-Deletionen bei primären cHL-Fällen**

In zehn von sechzehn auswertbaren Fällen der Kryoschnitte konnte eine *ETS1*-Deletion nachgewiesen werden (62 %). Abbildung 9 auf Seite 32 zeigt ein Beispiel einer *ETS1*-Deletion in einer HRS-Zelle. Bei dem Fall Nummer 11 konnte eine homozygote *ETS1*-Deletion dokumentiert werden. Die detaillierten Ergebnisse dieser Fälle finden sich in Tabelle A2 des Anhangs.

Tab. 9 Übersicht über die auf *ETS1*-Deletionen untersuchten Fälle

Fallnummer		Anzahl der Zellen mit <i>ETS1</i> -Deletion vs. Ploidie/ausgewertete Zellen		<i>ETS1</i> -Deletion <sup>1</sup>
		Auswerter 1	Auswerter 2	
Primärmaterial	1	8/20	8/22	ja
	2	9/18	14/22	ja
	3	5/14	9/20	ja
	4	nicht durchgeführt		-
	5	8/20	14/22	ja
	6	0/10	0/20	nein
	7	1/21	1/10	nein
	8	4/20	5/21	nein
	9	nicht auswertbar		-
	10	nicht auswertbar		-
	11	20/20	20/20	ja
	12	10/20	10/20	ja
	13	8/20	4/20	ja
	14	3/20	2/20	nein
	15	17/19	15/20	ja
	16	keine HRS-Zellen		-
	17	19/20	14/20	ja
	18	3/15	7/30	nein
	19	nicht auswertbar		-
	20	16/21	11/24	ja
	21	1/8	2/8	nein
Zelllinien	L428	1/20	2/20	nein
	HDLM2	0/20	0/20	nein
	KMH2	17/20	21/22	ja
	L1236	0/20	0/20	nein
	SUPHD1	14/20	16/21	ja
	UHO1	0/15	1/20	nein
	L540	0/20	0/21	nein

<sup>1</sup> in  $\geq 30$  % der ausgewerteten Zellen

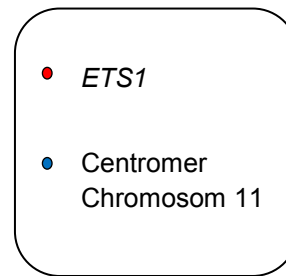
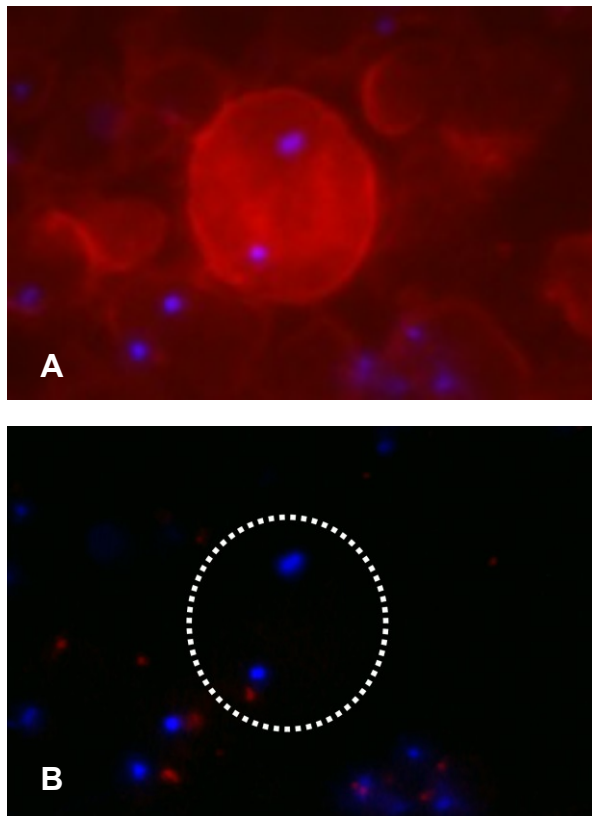


Abb. 9 *ETS1*-Deletion, Fallnummer 17, diploider Chromosomensatz der HRS-Zellen

A: Mittels CD30-Antikörper markierte HRS-Zelle, die beiden blauen Signale stellen die Centromere der zwei vorhandenen Chromosomen 11 dar.

B: Ein einzelnes rotes *ETS1*-Signal, diese Signalkonstellation zeigt eine *ETS1*-Deletion.

### 3.1.3 Weitere Ergebnisse der *ETS1*-Analysen

In den sieben cHL-Zelllinien konnten neben den zwei *ETS1*-Deletionen auch zwei *ETS1*-Zugwinne nachgewiesen werden, das entspricht 29 %. Drei cHL-Zelllinien (43 %) zeigten weder Deletionen noch Zugewinne (siehe Tab. A4).

Die Analyse der sechzehn auswertbaren primären cHL-Fälle zeigte neben den zehn Deletionen zwei Fälle mit *ETS1*-Zugewinnen (12 %) sowie vier Fälle ohne Deletionen oder Zugewinnen (25 %) (siehe Tab. A5).

### 3.2 Nachweis von *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen

Der Nachweis von *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen erfolgte mittels FICTION-Technik.

Die Untersuchung umfasste 21 primäre cHL-Fälle. Die Analyse war in 81 % erfolgreich (17 Fälle). In zwei Fällen waren die HRS-Zellen nicht in ausreichender Anzahl vorhanden, ein Fall war nicht auswertbar. Aufgrund von unzureichendem Material konnte ein weiterer Fall nicht durchgeführt werden.

In Tabelle 10 sind die Ergebnisse der Beobachtungen zusammengefasst.

Tab. 10 Übersicht über die auf *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen untersuchten Fälle

Fall- num- mer	Anzahl der Zellen mit <i>BCOR</i> -Deletion vs. Ploidie/ ausgewertete Zellen		Anzahl der Zellen mit <i>BCORL1</i> -Deletion vs. Ploidie/ ausgewertete Zellen		Deletion <sup>1</sup>	
	Auswer- ter 1	Auswer- ter 2	Auswer- ter 1	Auswer- ter 2	<i>BCOR</i>	<i>BCORL1</i>
1	11/20	12/20	5/20	8/20	ja	ja
2	0/20	1/20	0/20	3/20	nein	nein
3	nicht auswertbar				-	-
4	1/20	1/19	1/20	2/19	nein	nein
5	3/20	4/21	3/20	5/21	nein	nein
6	1/20	3/20	9/20	12/20	nein	ja
7	18/20	20/20	20/20	17/20	ja	ja
8	0/20	1/20	3/20	2/20	nein	nein
9	1/8	2/8	1/8	2/8	nein	nein
10	keine HRS-Zellen				-	-
11	1/10	3/20	0/10	3/20	nein	nein
12	19/20	17/20	12/20	8/20	ja	ja
13	8/10	19/20	0/10	4/20	ja	nein
14	0/19	2/21	0/19	2/21	nein	nein
15	19/20	19/20	19/20	17/20	ja	ja
16	1/20	1/8	2/20	1/8	nein	nein
17	0/20	2/20	1/20	1/20	nein	nein
18	nicht durchgeführt				-	-
19	14/20	12/20	7/20	9/20	ja	ja
20	6/10	6/10	4/10	4/10	ja	ja
21	keine HRS-Zellen				-	-

<sup>1</sup> in  $\geq 30$  % der ausgewerteten Zellen

### 3.2.1 *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen bei primären cHL-Fällen

Bei dem hier untersuchten Material konnte in je sieben Fällen der Nachweis einer *BCOR*- bzw. einer *BCORL1*-Deletion erbracht werden. Die Häufigkeit einer *BCOR*- bzw. *BCORL1*-Deletion lag damit bei 41 %. Dabei lag in sechs Fällen eine Deletion beider Gene vor, was 35 % entspricht. Abbildung 10 zeigt ein Beispiel einer



kombinierten *BCOR*- und *BCORL1*-Deletion in einer HRS-Zelle. In je einem weiteren Fall konnte die alleinige Deletion von *BCOR* bzw. *BCORL1* nachgewiesen werden. Der Fall mit der Nummer 7 war Träger eine homozygoten Deletion von *BCORL1*. Tabelle A3 im Anhang zeigt die detaillierten Ergebnisse dieser Fälle.

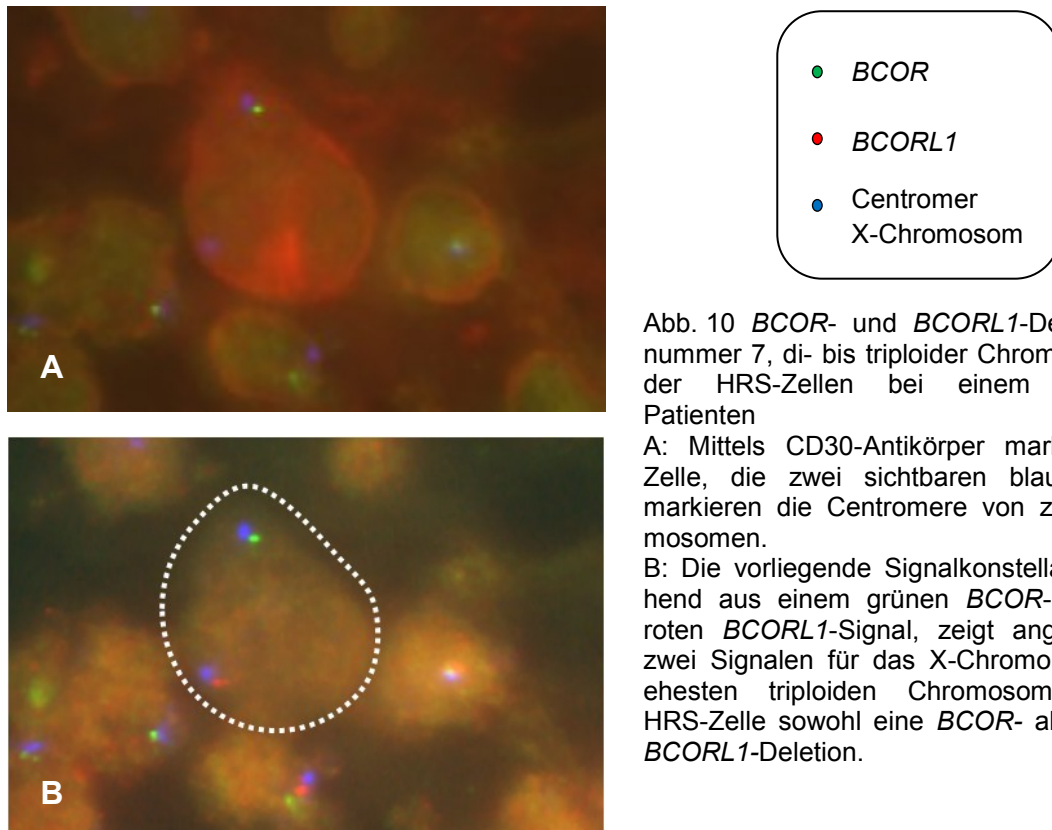


Abb. 10 *BCOR*- und *BCORL1*-Deletion, Fallnummer 7, di- bis triploider Chromosomensatz der HRS-Zellen bei einem männlichen Patienten

A: Mittels CD30-Antikörper markierte HRS-Zelle, die zwei sichtbaren blauen Signale markieren die Centromere von zwei X-Chromosomen.

B: Die vorliegende Signalkonstellation, bestehend aus einem grünen *BCOR*- und einem roten *BCORL1*-Signal, zeigt angesichts von zwei Signalen für das X-Chromosom bei am ehesten triploiden Chromosomensatz der HRS-Zelle sowohl eine *BCOR*- als auch eine *BCORL1*-Deletion.

### 3.2.2 Weitere Ergebnisse der *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen

Neben den je sieben nachgewiesenen Deletionen von *BCOR*- bzw. *BCORL1* traten auch Zugewinne dieser beiden Gene auf. Für *BCOR* konnte in zwei der siebzehn auswertbaren Fälle ein Zugewinn nachgewiesen werden, das entspricht 12 %. Bei *BCORL1* kam ein Zugewinn in drei Fällen vor (18 %). In insgesamt sechs Fällen wurden weder Deletionen noch Zugewinne nachgewiesen (35 %).

## **4 Diskussion**

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von chromosomalen Imbalancen an Genorten der Transkriptionsfaktoren ETS1, BCOR und BCORL1 mit selbst hergestellten FISH-Sonden in Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms.

### **4.1 Verlust der B-Zell-Identität**

Der Verlust der B-Zell-Identität ist ein wesentliches Merkmal der HRS-Zellen des cHL. Die HRS-Zellen weisen in ihrem variierendem Immunphänotyp Merkmale unterschiedlicher hämatopoetischer Zelllinien auf und weichen damit stark von dem Immunphänotyp der B-Zellen ab, von denen sie abstammen (Trumper, Brady et al., 1993, Küppers, Rajewsky et al., 1994). Bisher konnten trotz der erschwerten Bedingungen bei der zytogenetischen Untersuchung von cHL, wie z.B. der geringen Anzahl von HRS-Zellen im zellulären Infiltrat und der Variationsbreite des Ploidiegrads, bereits diverse Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die Teil des B-Zell-Programms sind und deren verringerte bzw. nicht vorhandene Expression den Verlust der B-Zell-Identität mitbestimmen. Dazu gehören unter anderem PU.1, OCT-2 und BOB-1, die physiologischerweise mitverantwortlich für die regelrechte B-Zell-Entwicklung sind (Re, Muschen et al., 2001, Stein, Marafioti et al., 2001, Torlakovic, Tierens et al., 2001).

Auf der Grundlage der aktuellen Studienlage wurden in der vorliegenden Arbeit die drei weiteren, mit B-Zellen in Beziehung stehenden Transkriptionsfaktoren ETS1, BCOR und BCORL1 hinsichtlich Veränderungen der Kopienanzahl ihrer Gene analysiert. Die im Rahmen dieser Untersuchungen identifizierten Deletionen sind ein Anhaltspunkt dafür, dass diese Transkriptionsfaktoren, bei denen zuvor keine Assoziation mit cHL bekannt war, eine potentielle Rolle für den Verlust der B-Zell-Identität der HRS-Zellen des cHL spielen.

### **4.2 Methodisch-technische Aspekte**

In der vorliegenden Arbeit wurde die FICTION-Methode (Fluorescence Immunophenotyping and Interphase Cytogenetics as a Tool for Investigation of Neoplasia), eine Kombination aus Fluoreszenz-Immunphänotypisierung und FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung), angewendet. Mit dieser Technik wurden zytogenetische Veränderungen von HRS-Zellen des cHL untersucht und diese nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung mit fluoreszierenden DNA-Sonden nach-

gewiesen. Die FICTION-Methode ist in Bezug auf das cHL sehr hilfreich, da die HRS-Zellen im Tumormaterial meist nur etwa 1 % der Zellen ausmachen (Küppers, 2009). Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Immunphänotypisierung die Identifizierung der HRS-Zellen deutlich erleichtert. Die für HRS-Zellen charakteristische starke CD30-Expression kann durch fluoreszenzmarkierte Antikörper identifiziert werden, sodass sich diese Zellen optisch vom zellulären Begleitinfiltrat abgrenzen. Parallel zu dem Immunphänotyp können so mittels konventioneller FISH-Technik gezielt chromosomale Aberrationen an einer Subpopulation von Zellen untersucht werden (Weber-Matthiesen, Winkemann et al., 1992, Giefing and Siebert, 2013). Ein Nachteil der Methode ist, dass ausschließlich bereits bekannte Chromosomenregionen gezielt untersucht werden können. Im Gegensatz dazu bietet die Array-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) die Möglichkeit einer genomweiten Überprüfung bezüglich DNA-Zugewinnen oder -Verlusten. Bei dieser Methode wird mithilfe immobilisierter DNA-Fragmente eine vergleichende Hybridisierung von Patienten- und Referenz-DNA durchgeführt (Hoppe, 2007). Aufgrund dieser Eigenschaften ermöglicht es die Array-CGH, bisher unbekannte chromosomale Imbalancen in HRS-Zellen zu finden. Für die in dieser Arbeit durchgeführte gezielte Analyse einzelner Gene ist jedoch FICTION die geeignete Methode.

Dabei können die nicht malignen, CD30-negativen Zellen des zellulären Infiltrats gut als Hybridisierungskontrolle und zur Beurteilung der Signalqualität herangezogen werden. Dennoch sind auch weiterhin Beurteilungen in Bezug auf Form und Größe der fluoreszierenden Zellen sowie der Vergleich der Fluoreszenzstärke zu den umliegenden Zellen durch den Auswerter und damit dessen subjektive Einschätzung sowie Erfahrungswerte notwendig.

#### **4.2.1 Deletionen des Transkriptionsfaktors *ETS1***

ETS1 ist ein Transkriptionsfaktor, der auf Chromosom 11 kodiert ist und zu der ETS Transkriptionsfaktor-Familie gehört, deren Mitglieder sich anhand der Bindungsdomäne EBS identifizieren lassen, die an das DNA-Konsensusmotiv GGAA/T von Zielgenen bindet (Singh, Swarnalatha et al., 2011). In Studien konnte gezeigt werden, dass Ets1 in verschiedenen Stadien Einfluss auf die Hämatopoese nimmt und eine Inaktivierung des Gens in Mäusen zu einer gestörten B-Zell-Entwicklung führt (Barton, Muthusamy et al., 1998, Eyquem, Chemin et al., 2004). *Ets1*-defiziente Mäuse weisen eine erhöhte Konzentration von IgM-sezernierenden Plasmazellen sowie erhöhte IgM-Serumtiter auf (Bories, Willerford et al., 1995, Barton, Muthusamy

et al., 1998). Wie nachgewiesen werden konnte, spielt Ets1 eine wichtige Rolle für den Klassenwechsel bestimmter Isotypen von Immunglobulinen in B-Zellen. Ein Mangel dieses TF führt bei Mäusen daher zu deutlich verminderten Serumkonzentrationen dieser Isotypen (Nguyen, Mouly et al., 2012). In einer 2007 veröffentlichten Studie wurde gezeigt, dass Ets1 den TF Blimp1 blockt und so die Expression von Genen induziert, die durch Blimp1 unterdrückt wird. Dazu gehört unter anderem auch das *Pax5*-Gen, welches wiederum die Expression von B-Zellspezifischen Genen unterstützt und die andere hämatopoetischer Zellpopulationen unterdrückt (Nutt, Heavey et al., 1999, John, Clements et al., 2008). Dies zeigt bereits die Bedeutung, die ETS1 für die B-Zell-Entwicklung und -Differenzierung hat. In einer DNA-Methylierungsstudie an cHL-Zelllinien zeigten die von ETS1 regulierten Ziel-Gene eine häufige Hypermethylierung, während *ETS1* selbst nicht hypermethyliert ist (Ammerpohl, Haake et al., 2012). Die Analyse bereits publizierter Genexpressionsdaten dokumentiert zudem, dass *ETS1* in HRS-Zellen gegenüber normalen B-Zellen deutlich verringert exprimiert wird (Küppers, Klein et al., 2003, Overbeck, Martin-Subero et al., 2012). Diese Erkenntnisse führen zusammen genommen zu der Hypothese, dass der genomische Verlust der *ETS1*-Expression bei cHL zu einer sekundären Hypermethylierung der Ziel-Gene führen könnte.

In den Untersuchungen der sechzehn primären cHL-Fälle wiesen zehn eine Deletion auf (Tab. A2), bei den Zelllinien wurde in zwei von sieben Fällen eine Deletion von *ETS1* nachgewiesen (Tab. A1). In einem Fall ergab die Auswertung des Primärmaterials eine homozygote Deletion. Es konnte somit gezeigt werden, dass das Transkriptionsfaktorgen *ETS1* in den HRS-Zellen des cHL wiederholt deletiert ist. In diesen Versuchen konnte folglich darlegt werden, dass die von Küppers et al., 2003 dokumentierte verminderte Expression, deren Ursache bisher unbekannt war, auf eine hohe Deletionsrate des *ETS1*-Gens in den HRS-Zellen zurückzuführen ist. Die von Ammerpohl et al., 2012 dokumentierte Hypermethylierung der Zielgene von ETS1 lässt sich daher als sekundäre Hypermethylierung, die aufgrund der Deletion dieses TF entsteht und dadurch zu Gen-Silencing führt, erklären.

Im Gegensatz zu cHL wurden bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) einschließlich der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL), die ihre B-Zell-Identität nicht verlieren, in aktuellen Studien Zugewinne der Kopienzahl von *ETS1* nachgewiesen (Pasqualucci, Trifonov et al., 2011). Für die beschriebenen Veränderungen von *ETS1* auf chromosomaler Ebene konnte bereits der Nachweis von parallel erhöhten mRNA-

Level bei DLBCL erbracht werden (Bonetti, Testoni et al., 2013). Diese 2013 von Bonetti et al. veröffentlichte Studie zeigt, dass bei DCBCL in 23 % der untersuchten Fälle ein Zugewinn des *ETS1*-Genorts vorliegt, die zu einer verstärkten Expression von *ETS1* führt. Damit weist die Studie nach, dass Veränderungen der Kopienzahl einen starken Effekt auf die Expression dieses Gens haben. Anhand einer Zelllinie konnte zudem nachgewiesen werden, dass *ETS1* zusammen mit dem TF FLI1 (Friend Leukemia Integration 1) das Überleben der neoplastischen Zellen positiv beeinflusst. In Zusammenschau mit der 2007 veröffentlichten Studie von John et al. würde eine vermehrte Expression von *ETS1* ebenfalls zu einer vermehrten Expression des *PAX5*-Gens führen, welches seinerseits die Expression von B-Zell-spezifischen Genen unterstützt und die anderer hämatopoetischer Zellpopulationen unterdrückt (John, Clements et al., 2008). Im Gegensatz dazu könnten die hier beobachteten Deletionen zu einer verminderten Aktivität von *ETS1* und so auch zu einer verminderten Expression des *PAX5*-Gens führen. Dies zusammen könnte eine abgeschwächte Expression von B-Zell-spezifischen Genen und eine verringerte Repression von Genen anderer hämatopoetischer Zellpopulationen verursachen und sich als Verlust der B-Zell-Identität manifestieren.

Zwischenzeitlich wurden immunhistochemische Untersuchungen bezüglich der Proteinexpression von *ETS1* an den auch hier untersuchten Fällen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen den mittels FICTION nachgewiesenen Deletionen und einer parallel erniedrigten Proteinexpression von *ETS1* (Overbeck, Martin-Subero et al., 2012). Diese Ergebnisse weisen dementsprechend die funktionellen Auswirkungen der beobachteten genomischen Verluste nach. Die identifizierte homozygote Deletion in einem der Fälle lässt dabei, mehr noch als die Deletionen im Allgemeinen, eine bedeutende Rolle dieser *ETS1*-Deletionen bei der Pathogenese des cHL vermuten.

Aufgrund der Tatsache, dass auch bei NHL Veränderungen gefunden wurden, erscheint es möglich, dass *ETS1* nicht nur beim cHL, sondern allgemein eine grundlegende Rolle in der B-Zell-Entwicklung und daher auch bei der Entstehung von anderen malignen Lymphomen spielt.

Weitere vergleichbare, veröffentlichte Studien, die sich mit *ETS1* und genetischen Abweichungen bei malignen Lymphomen befassen, sind zum heutigen Zeitpunkt nicht verfügbar.

#### 4.2.2 Deletionen der Transkriptionsfaktoren *BCOR* und *BCORL1*

Die beiden auf dem X-Chromosom kodierten Transkriptionsfaktoren *BCOR* und *BCORL1* sind homologe Gene. *BCOR* agiert als transkriptioneller Co-Repressor von *BCL6* (Huynh, Fischle et al., 2000). Über *Bcl6* reguliert *Bcor* im Mausexperiment die Entstehung von Keimzentren, in deren Entstehung *Bcl6* eine essentielle Rolle spielt, außerdem beeinflusst es die terminale B-Zell-Differenzierung und die Apoptose von B-Zellen in Keimzentren (Dent, Shaffer et al., 1997, Phan and Dalla-Favera, 2004). *BCORL1* wirkt ebenfalls als Co-Repressor, allerdings nicht von *BCL6*, sondern kann stattdessen an einige Klasse II-Histon-Deacetylasen binden und mit dem CtBP-Co-Repressor interagieren (Pagan, Arnold et al., 2007).

In bisher nicht publizierten Daten von Giefing et al. finden sich inaktivierende genetische Veränderungen von *BCOR* in vier von sieben untersuchten cHL-Zelllinien. Auch die mRNA-Expression zeigt sich in der Analyse von Brune et al. unveröffentlichten Daten im Vergleich zu normalen B-Zellen in untersuchten Zelllinien und Primärmaterial erniedrigt.

Bei den hier durchgeführten Untersuchungen bezüglich Deletionen der beiden Transkriptionsfaktorgene *BCOR* und *BCORL1* wiesen von den siebzehn auswertbaren primären cHL-Fällen sieben eine Deletion von *BCOR* und ebenfalls sieben Fälle eine Deletion von *BCORL1* auf. Dabei traten die Deletionen in sechs Fällen in Kombination auf und lediglich je einmal in isolierter Form (Tab. A3). Die Bedeutung dieser Beobachtung bleibt vorerst unklar. *BCOR* liegt auf dem p-Arm und *BCORL1* auf dem q-Arm des X-Chromosoms, sodass innerhalb des Chromosoms keine direkte räumliche Beziehung besteht. Für beide Gene liegt die Deletionsfrequenz in der untersuchten Gruppe somit bei 41 % und zeigt, dass sowohl *BCOR* als auch *BCORL1* häufig deletiert sind. Bei einem Fall zeigte sich eine homozygote Deletion von *BCORL1*. Anhand dieser Ergebnisse konnte somit gezeigt werden, dass die von Brune et al. dokumentierte verminderte mRNA-Expression von *BCOR* vermutlich durch die hier beobachteten Deletionen begründen lässt.

Unter Berücksichtigung der bisher bekannten Funktionen von *BCOR* und *BCORL1* kann insbesondere der Einfluss von *BCOR*-Deletionen als vermutlich bedeutsam eingeschätzt werden. Der dokumentierte Fall einer homozygoten *BCORL1*-Deletion legt jedoch auch eine einflussnehmende Rolle dieses TF bei der Pathogenese bzw. dem Verlust der B-Zell-Identität des cHL nahe. Der zu Beginn beschriebene Einfluss von *BCOR* auf die Apoptose über *BCL6* ist ein möglicher Erklärungsansatz für den

Mechanismus, der die HRS-Zellen im Keimzentrum befähigt, die Apoptose trotz fehlender funktionaler BCR umgehen zu können. Der Mechanismus, der den preapoptotischen HRS-Zellen das Entkommen der Apoptose im Keimzentrum ermöglicht, könnte daher zum Teil in den hier beschriebenen Deletionen begründet sein.

Auch bei einer weiteren hämatologischen Erkrankung, der AML (akute myeloische Leukämie), wurden bereits in Studien somatische *BCOR*- und *BCORL1*-Mutationen nachgewiesen (Grossmann, Tiacci et al., 2011, Li, Collins et al., 2011), und es gibt einen dokumentierten Fall einer Translokation von *BCOR* bei der APL (akute Promyelozyten-Leukämie) (Yamamoto, Tsuzuki et al., 2010). Diese erwiesenen Veränderungen bei mehreren hämatologischen Erkrankungen lassen darauf schließen, dass genetische Abweichungen der Transkriptionsfaktorgene *BCOR* und vermutlich auch *BCORL1*, nicht nur beim klassischen Hodgkin-Lymphom, sondern im Allgemeinen zu einer deregulierten B-Zell-Entwicklung führen.

#### **4.3 Fazit**

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ermöglichen die folgenden Schlussfolgerungen:

- 1) Deletionen des Transkriptionsfaktorgens *ETS1* treten in den Hodgkin-/Reed-Sternberg-Zellen des klassischen Hodgkin-Lymphoms gehäuft auf und konnten mit einer Frequenz von 29 % in Zelllinien und 62 % in Primärmaterial nachgewiesen werden.
- 2) Deletionen der beiden homologen Gene *BCOR* und *BCORL1* treten in den HRS-Zellen des cHL gehäuft auf, und konnten mit einer Frequenz von 41 % in Primärmaterial nachgewiesen werden.
- 3) Hinsichtlich der biologischen Funktion der Transkriptionsfaktoren *ETS1*, *BCOR* und *BCORL1* und der hier beobachteten häufigen genomischen Deletionen kann spekuliert werden, dass diese den genetischen Hintergrund der deregulierten B-Zell-Entwicklung von HRS-Zellen repräsentieren und einen Beitrag zum Verlust der B-Zell-Identität leisten.

#### **4.4 Ausblick**

Im Rahmen weiterer Studien bleibt anhand von funktionellen Experimenten zu klären, welchen konkreten Einfluss die *ETS1*-Deletionen auf den Phänotyp von Zellen haben. Des Weiteren bleibt offen, ob die hier an relativ geringer Fallzahl nachgewiesene hohe Deletionsfrequenz in HRS-Zellen sich auch in weiteren Studien bestätigen lassen kann.

Bei *BCOR* und *BCORL1* traten die Deletionen in der hier vorliegenden Untersuchung überwiegend in Kombination auf. In Folgeuntersuchungen gilt es zu klären, ob dieses Phänomen auch im Rahmen von Versuchen mit größeren Fallzahlen weiter verifiziert werden kann. In diesem Fall stellt sich die Frage, ob es bisher nicht bekannte funktionelle Zusammenhänge zwischen den beiden Co-Repressoren gibt, z.B. in Form eines übergeordneten Regulationswegs, anhand derer sich dieses Ereignis erklären lässt. Der Einfluss der *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen auf den Phänotyp von Zellen bedarf ebenfalls weiterer Experimente.



## 5 Zusammenfassung

Das von den lymphatischen B-Zellen abstammende Hodgkin-Lymphom tritt mit einer Inzidenz von 2,1-2,5 / 100.000 Einwohner in Europa auf und macht weltweit ca. 20 % der Lymphome aus. Die pathognomonischen mononukleären Hodgkin- und multinukleären Reed-Sternberg-Zellen (HRS-Zellen) des klassischen Hodgkin-Lymphoms (cHL) stellen dabei nur einen geringen Anteil von etwa 1 % des zellulären Infiltrats. Ein Hauptcharakteristikum der HRS-Zellen ist der stark variierende Phänotyp mit Merkmalen unterschiedlicher hämatopoetischer Zelllinien und der damit einhergehende Verlust der B-Zell-Identität. Dieser lässt sich bisher nur zum Teil durch die Deregulierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (TF) erklären.

Aufgrund ihrer Bedeutung für die B-Zell-Entwicklung wurden in der vorliegenden Arbeit die TF-Gene *ETS1*, *BCOR* sowie dessen Homolog *BCORL1* bezüglich chromosomaler Imbalancen in Form von Deletionen anhand der FICTION-Methode analysiert. Diese Methode verbindet die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit einer gezielten Immunphänotypisierung und erlaubt so, trotz des geringen Anteils maligner Zellen des cHL, die gezielte Untersuchung der HRS-Zellen.

Insgesamt wurde das TF-Gen *ETS1* an 7 Zelllinien sowie 16 primären cHL-Fällen erfolgreich untersucht. Bei diesen 23 Fällen wurden im Minimum 8 und im Maximum 21 HRS-Zellen analysiert, dabei lag der Durchschnitt bei 18,3 HRS-Zellen. Die Gegenkontrolle erfolgte mit im Durchschnitt 20,1 analysierten HRS-Zellen durch einen zweiten Auswerter. Es konnten bei 29 % der Zelllinien und 62 % der primären cHL-Fälle *ETS1*-Deletionen nachgewiesen werden. Die Auswertung der TF-Gene *BCOR* und *BCORL1* wurde an 17 primären cHL-Fällen erfolgreich durchgeführt. Durchschnittlich konnten bei minimal 8 und maximal 20 ausgewerteten HRS-Zellen 17,5 HRS-Zellen begutachtet werden, kontrolliert durch einen zweiten Auswerter mit im Durchschnitt 18,1 analysierten HRS-Zellen. Es zeigten sich sowohl *BCOR*- als auch *BCORL1*-Deletionen mit einer Häufigkeit von 41 %, wobei 35 % der auswertbaren primären cHL-Fälle eine kombinierte Deletion beider Gene aufwiesen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Deletionen der Transkriptionsfaktorengene *ETS1*, *BCOR* und *BCORL1* gehäuft in den HRS-Zellen des cHL auftreten. In Zusammenschau mit den biologischen Funktionen der zugehörigen Transkriptionsfaktoren lässt sich somit vermuten, dass die Deletionen einen Teil der genetischen Grundlage der deregulierten B-Zell-Entwicklung bilden und den Verlust der B-Zell-Identität beim cHL mitbewirken.

## 6 Literaturverzeichnis

Adams, B., Dorfler, P., Aguzzi, A., Kozmik, Z., Urbanek, P., Maurer-Fogy, I. and Busslinger, M. (1992): Pax-5 encodes the transcription factor BSAP and is expressed in B lymphocytes, the developing CNS, and adult testis. *Genes Dev*, 6, 1589-1607

Agnarsson, B. A. and Kadin, M. E. (1989): The immunophenotype of Reed-Sternberg cells. A study of 50 cases of Hodgkin's disease using fixed frozen tissues. *Cancer*, 63, 2083-2087

Altieri, A. and Hemminki, K. (2006): The familial risk of Hodgkin's lymphoma ranks among the highest in the Swedish Family-Cancer Database. *Leukemia*, 20, 2062-2063

Ammerpohl, O., Haake, A., Pellissery, S., Giefing, M., Richter, J., Balint, B., Kulis, M., Le, J., Bibikova, M., Drexler, H. G., Seifert, M., Shaknovic, R., Korn, B., Küppers, R., Martin-Subero, J. I. and Siebert, R. (2012): Array-based DNA methylation analysis in classical Hodgkin lymphoma reveals new insights into the mechanisms underlying silencing of B cell-specific genes. *Leukemia*, 26, 185-188

Bachman, K. E., Park, B. H., Rhee, I., Rajagopalan, H., Herman, J. G., Baylin, S. B., Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. (2003): Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer Cell*, 3, 89-95

Barberis, A., Widenhorn, K., Vitelli, L. and Busslinger, M. (1990): A novel B-cell lineage-specific transcription factor present at early but not late stages of differentiation. *Genes Dev*, 4, 849-859

Bargou, R. C., Emmerich, F., Krappmann, D., Bommert, K., Mapara, M. Y., Arnold, W., Royer, H. D., Grinstein, E., Greiner, A., Scheidereit, C. and Dorken, B. (1997): Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*, 100, 2961-2969

Bargou, R. C., Leng, C., Krappmann, D., Emmerich, F., Mapara, M. Y., Bommert, K., Royer, H. D., Scheidereit, C. and Dorken, B. (1996): High-level nuclear NF-kappa B and Oct-2 is a common feature of cultured Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *Blood*, 87, 4340-4347

Baron, B. W., Anastasi, J., Thirman, M. J., Furukawa, Y., Fears, S., Kim, D. C., Simone, F., Birkenbach, M., Montag, A., Sadhu, A., Zeleznik-Le, N. and McKeithan, T. W. (2002): The human programmed cell death-2 (PDCD2) gene is a target of BCL6 repression: implications for a role of BCL6 in the down-regulation of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 2860-2865

Barton, K., Muthusamy, N., Fischer, C., Ting, C. N., Walunas, T. L., Lanier, L. L. and Leiden, J. M. (1998): The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*, 9, 555-563

Bechtel, D., Kurth, J., Unkel, C. and Küppers, R. (2005): Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. *Blood*, 106, 4345-4350

Biggar, R. J., Jaffe, E. S., Goedert, J. J., Chaturvedi, A., Pfeiffer, R. and Engels, E. A. (2006): Hodgkin lymphoma and immunodeficiency in persons with HIV/AIDS. *Blood*, 108, 3786-3791

Bird, A. (2002): DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 16, 6-21

Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., Moch, H., Höfler, G. and Kreipe, H. (2012): *Pathologie*. 5. Aufl. Urban & Fischer in Elsevier, München

Bonetti, P., Testoni, M., Scandurra, M., Ponzoni, M., Piva, R., Mensah, A. A., Rinaldi, A., Kwee, I., Tibiletti, M. G., Iqbal, J., Greiner, T. C., Chan, W. C., Gaidano, G., Piris, M. A., Cavalli, F., Zucca, E., Inghirami, G. and Bertoni, F. (2013): Deregulation of ETS1 and FLI1 contributes to the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*,

Bories, J. C., Willerford, D. M., Grevin, D., Davidson, L., Camus, A., Martin, P., Stehelin, D. and Alt, F. W. (1995): Increased T-cell apoptosis and terminal B-cell differentiation induced by inactivation of the Ets-1 proto-oncogene. *Nature*, 377, 635-638

Briggs, N. C., Hall, H. I., Brann, E. A., Moriarty, C. J. and Levine, R. S. (2002): Cigarette smoking and risk of Hodgkin's disease: a population-based case-control study. *Am J Epidemiol*, 156, 1011-1020

Caldwell, R. G., Brown, R. C. and Longnecker, R. (2000): Epstein-Barr virus LMP2A-induced B-cell survival in two unique classes of EmuLMP2A transgenic mice. *J Virol*, 74, 1101-1113

Chaganti, S., Bell, A. I., Pastor, N. B., Milner, A. E., Drayson, M., Gordon, J. and Rickinson, A. B. (2005): Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood*, 106, 4249-4252

Chang, C. C., Ye, B. H., Chaganti, R. S. and Dalla-Favera, R. (1996): BCL-6, a POZ/zinc-finger protein, is a sequence-specific transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 6947-6952

Clodi, K. and Younes, A. (1997): Reed-Sternberg cells and the TNF family of receptors/ligands. *Leuk Lymphoma*, 27, 195-205

Cremer, T., Landegent, J., Bruckner, A., Scholl, H. P., Schardin, M., Hager, H. D., Devilee, P., Pearson, P. and van der Ploeg, M. (1986): Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum Genet*, 74, 346-352

Deacon, E. M., Pallesen, G., Niedobitek, G., Crocker, J., Brooks, L., Rickinson, A. B. and Young, L. S. (1993): Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med*, 177, 339-349

Dent, A. L., Shaffer, A. L., Yu, X., Allman, D. and Staudt, L. M. (1997): Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science*, 276, 589-592

Doerr, J. R., Malone, C. S., Fike, F. M., Gordon, M. S., Soghomonian, S. V., Thomas, R. K., Tao, Q., Murray, P. G., Diehl, V., Teitell, M. A. and Wall, R. (2005): Patterned CpG methylation of silenced B cell gene promoters in classical Hodgkin lymphoma-derived and primary effusion lymphoma cell lines. *J Mol Biol*, 350, 631-640

Drexler, H. G. (1992): Recent results on the biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. I. Biopsy material. *Leuk Lymphoma*, 8, 283-313

Eyquem, S., Chemin, K., Fasseu, M., Chopin, M., Sigaux, F., Cumano, A. and Bories, J. C. (2004): The development of early and mature B cells is impaired in mice deficient for the Ets-1 transcription factor. *Eur J Immunol*, 34, 3187-3196

Fan, Z., Yamaza, T., Lee, J. S., Yu, J., Wang, S., Fan, G., Shi, S. and Wang, C. Y. (2009): BCOR regulates mesenchymal stem cell function by epigenetic mechanisms. *Nat Cell Biol*, 11, 1002-1009

Ferlay, J., Parkin, D. M. and Steliarova-Foucher, E. (2010): Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*, 46, 765-781

Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-2917

Feuillard, J., Taylor, D., Casamayor-Palleja, M., Johnson, G. D. and MacLennan, I. C. (1995): Isolation and characteristics of tonsil centroblasts with reference to Ig class switching. *Int Immunol*, 7, 121-130

Foss, H. D., Reusch, R., Demel, G., Lenz, G., Anagnostopoulos, I., Hummel, M. and Stein, H. (1999): Frequent expression of the B-cell-specific activator protein in Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin's disease provides further evidence for its B-cell origin. *Blood*, 94, 3108-3113

Giefing, M. and Siebert, R. (2013): FISH and FICTION to detect chromosomal aberrations in lymphomas. *Methods Mol Biol*, 971, 227-244

Giefing, M., Winoto-Morbach, S., Sosna, J., Doring, C., Klapper, W., Kuppers, R., Bottcher, S., Adam, D., Siebert, R. and Schutze, S. (2013): Hodgkin-Reed-Sternberg cells in classical Hodgkin lymphoma show alterations of genes encoding the NADPH oxidase complex and impaired reactive oxygen species synthesis capacity. *PLoS One*, 8, e84928

Glaser, S. L., Lin, R. J., Stewart, S. L., Ambinder, R. F., Jarrett, R. F., Brousset, P., Pallesen, G., Gulley, M. L., Khan, G., O'Grady, J., Hummel, M., Preciado, M. V., Knecht, H., Chan, J. K. and Claviez, A. (1997): Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease: epidemiologic characteristics in international data. *Int J Cancer*, 70, 375-382

Gledhill, S., Gallagher, A., Jones, D. B., Krajewski, A. S., Alexander, F. E., Klee, E., Wright, D. H., O'Brien, C., Onions, D. E. and Jarrett, R. F. (1991): Viral involvement in Hodgkin's disease: detection of clonal type A Epstein-Barr virus genomes in tumour samples. *Br J Cancer*, 64, 227-232

Goldin, L. R., Pfeiffer, R. M., Gridley, G., Gail, M. H., Li, X., Mellemkjaer, L., Olsen, J. H., Hemminki, K. and Linet, M. S. (2004): Familial aggregation of Hodgkin lymphoma and related tumors. *Cancer*, 100, 1902-1908

Grasser, F. A., Murray, P. G., Kremmer, E., Klein, K., Remberger, K., Feiden, W., Reynolds, G., Niedobitek, G., Young, L. S. and Mueller-Lantzsch, N. (1994): Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood*, 84, 3792-3798

Grossmann, V., Tiacci, E., Holmes, A. B., Kohlmann, A., Martelli, M. P., Kern, W., Spanhol-Rosseto, A., Klein, H. U., Dugas, M., Schindela, S., Trifonov, V., Schnittger, S., Haferlach, C., Bassan, R., Wells, V. A., Spinelli, O., Chan, J., Rossi, R., Baldoni, S., De Carolis, L., Goetze, K., Serve, H., Peceny, R., Kreuzer, K. A., Oruzio, D., Specchia, G., Di Raimondo, F., Fabbiano, F., Sborgia, M., Liso, A., Farinelli, L., Rambaldi, A., Pasqualucci, L., Rabadan, R., Haferlach, T. and Falini, B. (2011): Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, 118, 6153-6163

Gulley, M. L., Eagan, P. A., Quintanilla-Martinez, L., Picado, A. L., Smir, B. N., Childs, C., Dunn, C. D., Craig, F. E., Williams, J. W., Jr. and Banks, P. M. (1994): Epstein-Barr virus DNA is abundant and monoclonal in the Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease: association with mixed cellularity subtype and Hispanic American ethnicity. *Blood*, 83, 1595-1602

Hamilton, J. A. (2008): Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol*, 8, 533-544

Hertel, C. B., Zhou, X. G., Hamilton-Dutoit, S. J. and Junker, S. (2002): Loss of B cell identity correlates with loss of B cell-specific transcription factors in Hodgkin/Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Oncogene*, 21, 4908-4920

Hinz, M., Lemke, P., Anagnostopoulos, I., Hacker, C., Krappmann, D., Mathas, S., Dorken, B., Zenke, M., Stein, H. and Scheidereit, C. (2002): Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med*, 196, 605-617

Hjalgrim, H., Askling, J., Sorensen, P., Madsen, M., Rosdahl, N., Storm, H. H., Hamilton-Dutoit, S., Eriksen, L. S., Frisch, M., Ekbom, A. and Melbye, M. (2000): Risk of Hodgkin's disease and other cancers after infectious mononucleosis. *J Natl Cancer Inst*, 92, 1522-1528

Hodgkin, T. (1832): On some Morbid Appearances of the Absorbent Glands and Spleen. *Med Chir Trans*, 17, 68-114

Hoppe, R. T. (2007): Hodgkin lymphoma. 2nd ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia [u.a.]

Human Genome March 2006 (NCBI36/hg18), [www.genome.ucsc.edu](http://www.genome.ucsc.edu)

Huynh, K. D., Fischle, W., Verdin, E. and Bardwell, V. J. (2000): BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*, 14, 1810-1823

Jarrett, R. F. (2002): Viruses and Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*, 13 Suppl 1, 23-29

John, S. A., Clements, J. L., Russell, L. M. and Garrett-Sinha, L. A. (2008): Ets-1 regulates plasma cell differentiation by interfering with the activity of the transcription factor Blimp-1. *J Biol Chem*, 283, 951-962

Jundt, F., Acikgoz, O., Kwon, S. H., Schwarzer, R., Anagnostopoulos, I., Wiesner, B., Mathas, S., Hummel, M., Stein, H., Reichardt, H. M. and Dorken, B. (2008): Aberrant expression of Notch1 interferes with the B-lymphoid phenotype of neoplastic B cells in classical Hodgkin lymphoma. *Leukemia*, 22, 1587-1594

Jundt, F., Anagnostopoulos, I., Forster, R., Mathas, S., Stein, H. and Dorken, B. (2002): Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 99, 3398-3403

Kanzler, H., Küppers, R., Hansmann, M. L. and Rajewsky, K. (1996): Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*, 184, 1495-1505

Kee, B. L., Quong, M. W. and Murre, C. (2000): E2A proteins: essential regulators at multiple stages of B-cell development. *Immunol Rev*, 175, 138-149

Kerzin-Storrar, L., Faed, M. J., MacGillivray, J. B. and Smith, P. G. (1983): Incidence of familial Hodgkin's disease. *Br J Cancer*, 47, 707-712

Klein, U. and Dalla-Favera, R. (2008): Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol*, 8, 22-33

Knippers, R. (2006): *Molekulare Genetik*. 9., komplett überarb. Aufl. Thieme, Stuttgart [u.a.]

Korkolopoulou, P., Cordell, J., Jones, M., Kaklamanis, L., Tsenga, A., Gatter, K. C. and Mason, D. Y. (1994): The expression of the B-cell marker mb-1 (CD79a) in Hodgkin's disease. *Histopathology*, 24, 511-515

Kulwichit, W., Edwards, R. H., Davenport, E. M., Baskar, J. F., Godfrey, V. and Raab-Traub, N. (1998): Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 11963-11968

Küppers, R. (2005): Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer*, 5, 251-262

Küppers, R. (2009): The biology of Hodgkin's lymphoma. *Nat Rev Cancer*, 9, 15-27

Küppers, R., Klein, U., Schwering, I., Distler, V., Brauninger, A., Cattoretti, G., Tu, Y., Stolovitzky, G. A., Califano, A., Hansmann, M. L. and Dalla-Favera, R. (2003): Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest*, 111, 529-537

Küppers, R., Rajewsky, K., Zhao, M., Simons, G., Laumann, R., Fischer, R. and Hansmann, M. L. (1994): Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91, 10962-10966

Lamprecht, B., Walter, K., Kreher, S., Kumar, R., Hummel, M., Lenze, D., Kochert, K., Bouhlef, M. A., Richter, J., Soler, E., Stadhouders, R., Johrens, K., Wurster, K. D., Callen, D. F., Harte, M. F., Giefing, M., Barlow, R., Stein, H., Anagnostopoulos, I., Janz, M., Cockerill, P. N., Siebert, R., Dorken, B., Bonifer, C. and Mathas, S. (2010): Derepression of an endogenous long terminal repeat activates the CSF1R proto-oncogene in human lymphoma. *Nat Med*, 16, 571-579, 571p following 579

Leu, Y. W., Yan, P. S., Fan, M., Jin, V. X., Liu, J. C., Curran, E. M., Welshons, W. V., Wei, S. H., Davuluri, R. V., Plass, C., Nephew, K. P. and Huang, T. H. (2004): Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. *Cancer Res*, 64, 8184-8192

Li, M., Collins, R., Jiao, Y., Ouillette, P., Bixby, D., Erba, H., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N. and Malek, S. N. (2011): Somatic mutations in the transcriptional corepressor gene BCORL1 in adult acute myelogenous leukemia. *Blood*, 118, 5914-5917

Li, Z., Wang, X., Yu, R. Y., Ding, B. B., Yu, J. J., Dai, X. M., Naganuma, A., Stanley, E. R. and Ye, B. H. (2005): BCL-6 negatively regulates expression of the NF-kappaB1 p105/p50 subunit. *J Immunol*, 174, 205-214

Maillard, I., Fang, T. and Pear, W. S. (2005): Regulation of lymphoid development, differentiation, and function by the Notch pathway. *Annu Rev Immunol*, 23, 945-974

Mancao, C., Altmann, M., Jungnickel, B. and Hammerschmidt, W. (2005): Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood*, 106, 4339-4344

Martin-Subero, J. I. (2001): Development of the multicolor FICTION technique. Applications to the diagnosis and research of malignant lymphomas. Dissertation. Barcelona

Martin-Subero, J. I., Chudoba, I., Harder, L., Gesk, S., Grote, W., Novo, F. J., Calasanz, M. J. and Siebert, R. (2002): Multicolor-FICTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol*, 161, 413-420

Martin-Subero, J. I., Klapper, W., Sotnikova, A., Callet-Bauchu, E., Harder, L., Bastard, C., Schmitz, R., Grohmann, S., Hoppner, J., Riemke, J., Barth, T. F., Berger, F., Bernd, H. W., Claviez, A., Gesk, S., Frank, G. A., Kaplanskaya, I. B., Moller, P., Parwaresch, R. M., Rudiger, T., Stein, H., Küppers, R., Hansmann, M. L.

and Siebert, R. (2006): Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma. *Cancer Res*, 66, 10332-10338

Mathas, S., Janz, M., Hummel, F., Hummel, M., Wollert-Wulf, B., Lusatis, S., Anagnostopoulos, I., Lietz, A., Sigvardsson, M., Jundt, F., Johrens, K., Bommert, K., Stein, H. and Dorken, B. (2006): Intrinsic inhibition of transcription factor E2A by HLH proteins ABF-1 and Id2 mediates reprogramming of neoplastic B cells in Hodgkin lymphoma. *Nat Immunol*, 7, 207-215

Middleton, T., Gahn, T. A., Martin, J. M. and Sugden, B. (1991): Immortalizing genes of Epstein-Barr virus. *Adv Virus Res*, 40, 19-55

Muschen, M., Rajewsky, K., Brauninger, A., Baur, A. S., Oudejans, J. J., Roers, A., Hansmann, M. L. and Küppers, R. (2000): Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*, 191, 387-394

Nguyen, H. V., Mouly, E., Chemin, K., Luinaud, R., Despres, R., Femand, J. P., Arnulf, B. and Bories, J. C. (2012): The Ets-1 transcription factor is required for Stat1-mediated T-bet expression and IgG2a class switching in mouse B cells. *Blood*, 119, 4174-4181

Niedobitek, G., Kremmer, E., Herbst, H., Whitehead, L., Dawson, C. W., Niedobitek, E., von Ostau, C., Rooney, N., Grasser, F. A. and Young, L. S. (1997): Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood*, 90, 1664-1672

Nossal, G. J. and Lederberg, J. (1958): Antibody production by single cells. *Nature*, 181, 1419-1420

Novik, K. L., Nimmrich, I., Genc, B., Maier, S., Piepenbrock, C., Olek, A. and Beck, S. (2002): Epigenomics: genome-wide study of methylation phenomena. *Curr Issues Mol Biol*, 4, 111-128

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G. and Busslinger, M. (1999): Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*, 401, 556-562

Otto, C., Giefing, M., Massow, A., Vater, I., Gesk, S., Schlesner, M., Richter, J., Klapper, W., Hansmann, M. L., Siebert, R. and Kuppers, R. (2012): Genetic lesions of the TRAF3 and MAP3K14 genes in classical Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol*, 157, 702-708

Overbeck, B. M., Martin-Subero, J. I., Ammerpohl, O., Klapper, W., Siebert, R. and Giefing, M. (2012): ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 97, 1612-1614

Pagan, J. K., Arnold, J., Hanchard, K. J., Kumar, R., Bruno, T., Jones, M. J., Richard, D. J., Forrest, A., Spurdle, A., Verdin, E., Crossley, M., Fanciulli, M., Chenevix-Trench, G., Young, D. B. and Khanna, K. K. (2007): A novel corepressor, BCoR-L1, represses transcription through an interaction with CtBP. *J Biol Chem*, 282, 15248-15257



Paltiel, O., Schmit, T., Adler, B., Rachmilevitz, E. A., Polliack, A., Cohen, A., Haim, N., Shachar, M. B., Epelbaum, R., Barchana, M., Cohen, R. and Ben Yehuda, D. (2000): The incidence of lymphoma in first-degree relatives of patients with Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma: results and limitations of a registry-linked study. *Cancer*, 88, 2357-2366

Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V. A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., Chan, J., Bhagat, G., Chadburn, A., Gaidano, G., Mullighan, C. G., Rabadan, R. and Dalla-Favera, R. (2011): Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat Genet*, 43, 830-837

Phan, R. T. and Dalla-Favera, R. (2004): The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature*, 432, 635-639

Pixley, F. J. and Stanley, E. R. (2004): CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol*, 14, 628-638

Pongubala, J. M., Northrup, D. L., Lancki, D. W., Medina, K. L., Treiber, T., Bertolino, E., Thomas, M., Grosschedl, R., Allman, D. and Singh, H. (2008): Transcription factor EBF restricts alternative lineage options and promotes B cell fate commitment independently of Pax5. *Nat Immunol*, 9, 203-215

Portis, T., Dyck, P. and Longnecker, R. (2003): Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood*, 102, 4166-4178

Portis, T. and Longnecker, R. (2003): Epstein-Barr virus LMP2A interferes with global transcription factor regulation when expressed during B-lymphocyte development. *J Virol*, 77, 105-114

Pui, J. C., Allman, D., Xu, L., DeRocco, S., Karnell, F. G., Bakkour, S., Lee, J. Y., Kadesch, T., Hardy, R. R., Aster, J. C. and Pear, W. S. (1999): Notch1 expression in early lymphopoiesis influences B versus T lineage determination. *Immunity*, 11, 299-308

Rajewsky, K. (1996): Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381, 751-758

Re, D., Muschen, M., Ahmadi, T., Wickenhauser, C., Staratschek-Jox, A., Holtick, U., Diehl, V. and Wolf, J. (2001): Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res*, 61, 2080-2084

Reed, D. M. (1902): On the Pathological Changes in Hodgkin's Disease, with Especial Reference to its Relation to Tuberculosis. *Johns Hopkins Hospital Reports*, 10, 133-196

Robert-Koch-Institut (2010): Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 132-139

Robert-Koch-Institut (2012): Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe, 104-107

Scheeren, F. A., Diehl, S. A., Smit, L. A., Beaumont, T., Naspetti, M., Bende, R. J., Blom, B., Karube, K., Ohshima, K., van Noesel, C. J. and Spits, H. (2008): IL-21 is expressed in Hodgkin lymphoma and activates STAT5: evidence that activated STAT5 is required for Hodgkin lymphomagenesis. *Blood*, 111, 4706-4715

Schmidt, A., Schmitz, R., Giefing, M., Martin-Subero, J. I., Gesk, S., Vater, I., Massow, A., Maggio, E., Schneider, M., Hansmann, M. L., Siebert, R. and Kuppers, R. (2010): Rare occurrence of biallelic CYLD gene mutations in classical Hodgkin lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 49, 803-809

Schmitz, R., Hansmann, M. L., Bohle, V., Martin-Subero, J. I., Hartmann, S., Mechttersheimer, G., Klapper, W., Vater, I., Giefing, M., Gesk, S., Stanelle, J., Siebert, R. and Küppers, R. (2009): TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. *J Exp Med*, 206, 981-989

Schwab, U., Stein, H., Gerdes, J., Lemke, H., Kirchner, H., Schaadt, M. and Diehl, V. (1982): Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg-Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. *Nature*, 299, 65-67

Seitz, V., Hummel, M., Marafioti, T., Anagnostopoulos, I., Assaf, C. and Stein, H. (2000): Detection of clonal T-cell receptor gamma-chain gene rearrangements in Reed-Sternberg cells of classic Hodgkin disease. *Blood*, 95, 3020-3024

Serandour, A. A., Avner, S., Percevault, F., Demay, F., Bizot, M., Lucchetti-Miganeh, C., Barloy-Hubler, F., Brown, M., Lupien, M., Metivier, R., Salbert, G. and Eeckhoutte, J. (2011): Epigenetic switch involved in activation of pioneer factor FOXA1-dependent enhancers. *Genome Res*, 21, 555-565

Shaffer, A. L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E. P. and Staudt, L. M. (2000): BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*, 13, 199-212

Shenoy, P., Maggioncalda, A., Malik, N. and Flowers, C. R. (2011): Incidence patterns and outcomes for hodgkin lymphoma patients in the United States. *Adv Hematol*, 2011, 725219

Singh, A. K., Swarnalatha, M. and Kumar, V. (2011): c-ETS1 facilitates G1/S-phase transition by up-regulating cyclin E and CDK2 genes and cooperates with hepatitis B virus X protein for their deregulation. *J Biol Chem*, 286, 21961-21970

Stein, H., Marafioti, T., Foss, H. D., Laumen, H., Hummel, M., Anagnostopoulos, I., Wirth, T., Demel, G. and Falini, B. (2001): Down-regulation of BOB.1/OBF.1 and Oct2 in classical Hodgkin disease but not in lymphocyte predominant Hodgkin disease correlates with immunoglobulin transcription. *Blood*, 97, 496-501

Sternberg, C. (1898): Über eine eigenartige unter dem Bilde der Pseudoleukämie verlaufende Tuberculose des lymphatischen Apparates. *Zeitschrift für Heilkunde*, 19, 21-90

Swerdlow, S. H. (2008): WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4. ed. Internat. Agency for Research on Cancer, Lyon

Szyf, M. (2003): Targeting DNA methylation in cancer. *Ageing Res Rev*, 2, 299-328

Thomas, R. K., Re, D., Wolf, J. and Diehl, V. (2004): Part I: Hodgkin's lymphoma--molecular biology of Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Lancet Oncol*, 5, 11-18

Torlakovic, E., Tierens, A., Dang, H. D. and Delabie, J. (2001): The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol*, 159, 1807-1814

Trumper, L. H., Brady, G., Bagg, A., Gray, D., Loke, S. L., Griesser, H., Wagman, R., Braziel, R., Gascoyne, R. D., Vicini, S. and et al. (1993): Single-cell analysis of Hodgkin and Reed-Sternberg cells: molecular heterogeneity of gene expression and p53 mutations. *Blood*, 81, 3097-3115

Uhara, H., Sato, Y., Mukai, K., Akao, I., Matsuno, Y., Furuya, S., Hoshikawa, T., Shimosato, Y. and Saida, T. (1990): Detection of Epstein-Barr virus DNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Jpn J Cancer Res*, 81, 272-278

Ushmorov, A., Leithauser, F., Sakk, O., Weinhausel, A., Popov, S. W., Moller, P. and Wirth, T. (2006): Epigenetic processes play a major role in B-cell-specific gene silencing in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*, 107, 2493-2500

van Noesel, C. J. and van Lier, R. A. (1993): Architecture of the human B-cell antigen receptors. *Blood*, 82, 363-373

van Noesel, M. M., van Bezouw, S., Voute, P. A., Herman, J. G., Pieters, R. and Versteeg, R. (2003): Clustering of hypermethylated genes in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer*, 38, 226-233

Wamstad, J. A. and Bardwell, V. J. (2007): Characterization of Bcor expression in mouse development. *Gene Expr Patterns*, 7, 550-557

Wamstad, J. A., Corcoran, C. M., Keating, A. M. and Bardwell, V. J. (2008): Role of the transcriptional corepressor Bcor in embryonic stem cell differentiation and early embryonic development. *PLoS One*, 3, e2814

Watanabe, K., Yamashita, Y., Nakayama, A., Hasegawa, Y., Kojima, H., Nagasawa, T. and Mori, N. (2000): Varied B-cell immunophenotypes of Hodgkin/Reed-Sternberg cells in classic Hodgkin's disease. *Histopathology*, 36, 353-361

Weber-Matthiesen, K., Deerberg, J., Poetsch, M., Grote, W. and Schlegelberger, B. (1995): Numerical chromosome aberrations are present within the CD30+ Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analyzed cases of Hodgkin's disease. *Blood*, 86, 1464-1468

Weber-Matthiesen, K., Winkemann, M., Muller-Hermelink, A., Schlegelberger, B. and Grote, W. (1992): Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J Histochem Cytochem*, 40, 171-175

Wilks, S. (1865): Cases of enlargement of the lymphatic glands and spleen (or Hodgkin's disease) with remarks. Guy's Hospital Reports, 11, 56-67

Wlodarska, I., Nooyen, P., Maes, B., Martin-Subero, J. I., Siebert, R., Pauwels, P., De Wolf-Peeters, C. and Hagemeijer, A. (2003): Frequent occurrence of BCL6 rearrangements in nodular lymphocyte predominance Hodgkin lymphoma but not in classical Hodgkin lymphoma. Blood, 101, 706-710

Yamamoto, Y., Tsuzuki, S., Tsuzuki, M., Handa, K., Inaguma, Y. and Emi, N. (2010): BCOR as a novel fusion partner of retinoic acid receptor alpha in a t(X;17)(p11;q12) variant of acute promyelocytic leukemia. Blood, 116, 4274-4283

## 7 Anhang

Tab. A1 Zelllinien mit *ETS1*-Deletionen

Zell- linie	Ploidie- grad	Signal- konstellationen  O = orange (ETS1), B = blau (Centromer Chromosom 11)		Anzahl der Zellen	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidie- grad	Ergebnis
KMH2	3	Auswerter 1	1 O 4 B	1	ja	ja	DELETION
			2 O 3 B	1	ja	ja	
			2 O 4 B	15	ja	ja	
			3 O 3 B	2	nein	nein	
			4 O 4 B	1	nein	nein	
			gesamt	20	17 (85 %)	17 (85 %)	
		Auswerter 2	1 O 4 B	1	ja	ja	
			2 O 4 B	17	ja	ja	
			2 O 3 B	3	ja	ja	
			3 O 4 B	1	ja	nein	
			gesamt	22	22 (100 %)	21 (95 %)	
SUPHD1	2	Auswerter 1	0 O 1 B	1	ja	ja	DELETION
			1 O 1 B	2	nein	ja	
			1 O 2 B	11	ja	ja	
			2 O 2 B	4	nein	nein	
			2 O 3 B	1	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	
			gesamt	20	13 (65 %)	14 (70 %)	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	
			1 O 1 B	1	nein	ja	
			1 O 2 B	13	ja	ja	
			1 O 3 B	1	ja	ja	
			2 O 2 B	4	nein	nein	
			2 O 5 B	1	ja	nein	
			gesamt	21	16 (76 %)	16 (76 %)	

Tab. A2 primäre cHL-Fälle mit *ETS1*-Deletionen

Num- mer	Ploidie- grad	Signal- konstellationen in CD30 positiven Zellen		Anzahl der Zellen	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidie- grad	Ergebnis
		O = orange (ETS1), B = blau (Centromer Chromosom 11)					
1	3-4	Auswerter 1	1 O 2 B	1	ja	ja	DELETION
			2 O 2 B	4	nein	ja	
			2 O 4 B	3	ja	ja	
			3 O 3 B	3	nein	nein	
			3 O 4 B	2	ja	nein	
			3 O 6 B	1	ja	nein	
			4 O 4 B	4	nein	nein	
			4 O 5 B	1	ja	nein	
			4 O 6 B	1	ja	nein	
			gesamt	20	9 (45 %)	8 (40 %)	
		Auswerter 2	0 O 2 B	1	ja	ja	
			1 O 1 B	1	nein	ja	
			1 O 2 B	1	ja	ja	
			2 O 1 B	1	nein	ja	
			2 O 2 B	2	nein	ja	
			2 O 3 B	1	ja	ja	
			2 O 4 B	1	ja	ja	
			3 O 2 B	1	nein	nein	
			3 O 3 B	3	nein	nein	
			4 O 3 B	1	nein	nein	
			4 O 4 B	3	nein	nein	
			4 O 5 B	2	ja	nein	
			4 O 6 B	1	ja	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	
			5 O 7 B	1	ja	nein	
			6 O 6 B	1	nein	nein	
			gesamt	22	8 (36 %)	8 (36 %)	

2	2 oder 4	Auswerter 1	0 0 1 B	2	ja	ja	DELETION
			0 0 2 B	4	ja	ja	
			2 0 2 B	3	nein	nein	
			1 0 2 B	3	ja	ja	
			2 0 2 B	4	nein	nein	
			3 0 2 B	1	nein	nein	
			3 0 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>18</b>	<b>9 (50 %)</b>	<b>9 (50 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 1 B	5	ja	ja	
			1 0 1 B	3	nein	ja	
			1 0 2 B	5	ja	ja	
			1 0 3 B	1	ja	ja	
			2 0 1 B	1	nein	nein	
			2 0 2 B	4	nein	nein	
			2 0 3 B	1	ja	nein	
			3 0 1 B	1	nein	nein	
			3 0 2 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>22</b>	<b>12 (55 %)</b>	<b>14 (64 %)</b>	
3	3	Auswerter 1	2 0 2 B	4	nein	ja	DELETION
			2 0 5 B	1	ja	ja	
			3 0 3 B	5	nein	nein	
			3 0 4 B	1	ja	nein	
			4 0 1 B	1	nein	nein	
			4 0 4 B	1	nein	nein	
			6 0 2 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>14</b>	<b>2 (14 %)</b>	<b>5 (36 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 0 B	1	nein	ja	
			1 0 0 B	1	nein	ja	
			1 0 1 B	1	nein	ja	
			2 0 1 B	1	nein	ja	
			2 0 2 B	4	nein	ja	
			2 0 4 B	1	ja	ja	
			3 0 1 B	1	nein	nein	
			3 0 2 B	2	nein	nein	
			3 0 3 B	4	nein	nein	
			4 0 2 B	1	nein	nein	
			4 0 4 B	2	nein	nein	
			5 0 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>9 (45 %)</b>	

5	3-4	Auswerter 1	0 0 3 B	1	ja	ja	DELETION
			1 0 2 B	1	ja	ja	
			2 0 2 B	3	nein	ja	
			2 0 3 B	2	ja	ja	
			2 0 6 B	1	ja	ja	
			3 0 2 B	1	nein	nein	
			3 0 3 B	2	nein	nein	
			3 0 4 B	1	ja	nein	
			4 0 4 B	2	nein	nein	
			4 0 5 B	1	ja	nein	
			4 0 6 B	1	ja	nein	
			5 0 4 B	1	nein	nein	
			5 0 5 B	2	nein	nein	
			5 0 10 B	1	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	
		Auswerter 2	1 0 1 B	2	nein	ja	
			1 0 2 B	2	ja	ja	
			2 0 1 B	1	nein	ja	
			2 0 2 B	4	nein	ja	
			2 0 3 B	4	ja	ja	
			2 0 4 B	1	ja	ja	
			3 0 3 B	1	nein	nein	
			4 0 3 B	1	nein	nein	
			4 0 4 B	2	nein	nein	
			4 0 5 B	1	ja	nein	
			5 0 3 B	1	nein	nein	
			6 0 9 B	1	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>9 (43 %)</b>	<b>14 (67 %)</b>	
11	3-4	Auswerter 1	0 0 0 B	1	nein	ja	DELETION
			0 0 1 B	2	ja	ja	
			0 0 2 B	11	ja	ja	
			0 0 3 B	3	ja	ja	
			1 0 2 B	1	ja	ja	
			2 0 2 B	2	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>17 (85 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 0 B	2	nein	ja	
			0 0 1 B	3	ja	ja	
			0 0 2 B	6	ja	ja	
			0 0 3 B	7	ja	ja	
			0 0 5 B	2	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>18 (90 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	



12	2-4	Auswerter 1	0 0 2 B	2	ja	ja	DELETION
			0 0 3 B	1	ja	ja	
			1 0 1 B	2	nein	ja	
			1 0 3 B	1	ja	ja	
			1 0 2 B	4	ja	ja	
			2 0 2 B	2	nein	nein	
			2 0 3 B	2	ja	nein	
			2 0 4 B	3	ja	nein	
			3 0 2 B	2	nein	nein	
			3 0 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>10 (50 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 2 B	2	ja	ja	
			0 0 3 B	1	ja	ja	
			1 0 1 B	2	nein	ja	
			1 0 3 B	1	ja	ja	
			1 0 2 B	4	ja	ja	
			2 0 2 B	2	nein	nein	
			2 0 3 B	2	ja	nein	
			2 0 4 B	3	ja	nein	
			3 0 2 B	2	nein	nein	
			3 0 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>10 (50 %)</b>	
13	2 oder 4	Auswerter 1	1 0 1 B	1	nein	ja	DELETION
			1 0 2 B	4	ja	ja	
			1 0 3 B	2	ja	ja	
			1 0 4 B	1	ja	ja	
			2 0 2 B	6	nein	nein	
			2 0 3 B	3	ja	nein	
			2 0 4 B	1	ja	nein	
			3 0 3 B	2	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>11 (55 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	
		Auswerter 2	1 0 1 B	1	nein	ja	
			1 0 2 B	1	ja	ja	
			2 0 1 B	1	nein	nein	
			1 0 3 B	2	ja	ja	
			2 0 2 B	3	nein	nein	
			2 0 3 B	4	ja	nein	
			3 0 3 B	6	nein	nein	
			2 0 4 B	2	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	

15	4-5	Auswerter 1	1 O 1 B	2	nein	ja	DELETION
			2 O 2 B	3	nein	ja	
			2 O 3 B	2	ja	ja	
			3 O 2 B	1	nein	ja	
			3 O 3 B	7	nein	ja	
			3 O 4 B	2	ja	ja	
			4 O 4 B	1	nein	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>19</b>	<b>4 (21 %)</b>	<b>17 (89 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	
			1 O 1 B	1	nein	ja	
			1 O 3 B	1	ja	ja	
			2 O 2 B	4	nein	ja	
			3 O 2 B	1	nein	ja	
			3 O 3 B	6	nein	ja	
			3 O 4 B	1	ja	ja	
			4 O 3 B	1	nein	nein	
			4 O 4 B	3	nein	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>15 (75 %)</b>	
17	2	Auswerter 1	0 O 0 B	1	nein	ja	DELETION
			0 O 1 B	4	ja	ja	
			0 O 2 B	1	ja	ja	
			1 O 0 B	2	nein	ja	
			1 O 1 B	3	nein	ja	
			1 O 2 B	8	ja	ja	
			2 O 2 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>19 (95 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 0 B	3	nein	ja	
			0 O 1 B	2	ja	ja	
			0 O 2 B	1	ja	ja	
			1 O 0 B	1	nein	ja	
			1 O 1 B	5	nein	ja	
			1 O 2 B	2	ja	ja	
			2 O 2 B	1	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	
			2 O 4 B	2	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>14 (70 %)</b>	

20	4-7	Auswerter 1	0 O 1 B	1	ja	ja	DELETION
			1 O 1 B	1	nein	ja	
			2 O 0 B	1	nein	ja	
			2 O 2 B	7	nein	ja	
			2 O 3 B	1	ja	ja	
			3 O 3 B	4	nein	ja	
			3 O 4 B	1	ja	ja	
			4 O 2 B	1	nein	nein	
			4 O 4 B	1	nein	nein	
			6 O 6 B	2	nein	nein	
			8 O 8 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>3 (14 %)</b>	<b>16 (76 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	
			0 O 3 B	1	ja	ja	
			1 O 4 B	1	ja	ja	
			2 O 2 B	2	nein	ja	
			2 O 4 B	1	ja	ja	
			3 O 3 B	3	nein	ja	
			3 O 4 B	2	ja	ja	
			4 O 4 B	5	nein	nein	
			6 O 2 B	1	nein	nein	
			6 O 4 B	1	nein	nein	
			6 O 6 B	1	nein	nein	
			7 O 7 B	1	nein	nein	
			8 O 8 B	1	nein	nein	
			9 O 5 B	1	nein	nein	
			10 O 10 B	1	nein	nein	
			>10 O >10 B	1	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>24</b>	<b>6 (25 %)</b>	<b>11 (46 %)</b>	

Tab. A3 primäre cHL-Fälle mit *BCOR*- und *BCORL1*-Deletionen

Nummer und Geschlecht	Ploidiegrad	Signalkonstellationen in CD30 positiven Zellen  G = grün (BCOR) O = orange (BCORL1), B = blau (Centromer X-Chr.)	Anzahl der Zellen	G < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad G+O	Ergebnis	
1 ♂	3-4	Auswerter 1	1 G 1 O 1 B	2	nein	ja	nein	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	5	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			2 G 1 O 3 B	1	ja	nein	ja	ja	nein	
			2 G 3 O 3 B	4	ja	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 4 B	3	ja	nein	ja	nein	nein	
		gesamt	20	15 (75 %)	11 (55 %)	6 (30 %)	5 (25 %)	3 (15 %)		
		Auswerter 2	1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 O 3 B	1	ja	ja	ja	nein	nein	
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 4 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	nein	
			2 G 2 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 4 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 3 O 4 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			4 G 6 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	11 (55 %)	12 (60 %)	7 (35 %)	8 (40 %)	6 (30 %)	

6 ♂	2-3	Auswerter 1	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	DELETION BCORL1
			1 G 0 0 1 B	4	nein	nein	ja	ja	nein	
			1 G 0 0 2 B	1	ja	nein	ja	ja	nein	
			1 G 1 0 1 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 0 0 2 B	3	nein	nein	ja	ja	nein	
			2 G 1 0 2 B	4	nein	nein	ja	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	3 (15 %)	1 (5 %)	14 (70 %)	9 (45 %)	1 (5 %)	
		Auswerter 2	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			0 G 0 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			0 G 1 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 0 0 1 B	7	nein	nein	ja	ja	nein	
			1 G 1 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	2	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 0 0 2 B	2	nein	nein	ja	ja	nein	
			2 G 1 0 2 B	3	nein	nein	ja	nein	nein	
			3 G 1 0 3 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	
			4 G 0 0 3 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			gesamt	20	5 (25 %)	3 (15 %)	18 (90 %)	12 (60 %)	2 (10 %)	
7 ♂	2-3	Auswerter 1	0 G 1 0 1 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 0 0 2 B	3	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 0 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 0 2 B	11	ja	ja	ja	ja	ja	
			2 G 1 0 2 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			1 G 1 0 3 B	2	ja	ja	ja	ja	ja	
			2 G 1 0 4 B	1	ja	nein	ja	ja	nein	
			gesamt	20	18 (90 %)	18 (90 %)	18 (90 %)	20 (100 %)	18 (90 %)	
		Auswerter 2	0 G 1 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 0 0 1 B	2	nein	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 0 2 B	13	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 0 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 0 3 B	2	ja	ja	ja	nein	nein	
			gesamt	20	18 (90 %)	20 (100 %)	19 (95 %)	17 (85 %)	17 (85 %)	

12 ♂	2-4	Auswerter 1	0 G 1 O 1 B	4	ja	ja	nein	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 O 2 B	3	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 O 2 B	7	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>15 (75 %)</b>	<b>19 (95 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>12 (60 %)</b>	<b>11 (55 %)</b>	
		Auswerter 2	0 G 0 O 0 B	2	nein	ja	nein	ja	ja	
			0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 2 O 2 B	8	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 3 B	1	ja	ja	ja	nein	nein	
			2 G 1 O 1 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	
			2 G 3 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 4 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>12 (60 %)</b>	<b>17 (75 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	<b>7 (35 %)</b>	
13 ♀	2 oder 4	Auswerter 1	0 G 2 O 1 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	DELETION BCOR
			0 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 4 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 6 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>9 (90 %)</b>	<b>8 (80 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	
			0 G 2 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	
			0 G 3 O 4 B	1	ja	ja	ja	nein	nein	
			1 G 0 O 1 B	1	nein	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 4 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>19 (95 %)</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	

15 ♀	4-5	Auswerter 1	1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 2 O 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 2 O 2 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	
			2 G 1 O 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			2 G 2 O 2 B	6	nein	ja	nein	ja	ja	
			2 G 3 O 2 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			2 G 3 O 4 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			3 G 1 O 3 B	1	nein	ja	ja	ja	ja	
			3 G 3 O 2 B	2	nein	ja	nein	ja	ja	
			3 G 3 O 3 B	2	nein	ja	nein	ja	ja	
			3 G 3 O 4 B	2	ja	ja	ja	ja	nein	
			4 G 4 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	5 (25 %)	19 (95 %)	5 (25 %)	19 (95 %)	17 (85 %)	
		Auswerter 2	1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			2 G 3 O 2 B	3	nein	ja	nein	ja	ja	
			2 G 2 O 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			2 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	
			3 G 2 O 3 B	1	nein	ja	ja	ja	ja	
			3 G 3 O 3 B	7	nein	ja	nein	ja	ja	
			3 G 3 O 4 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			3 G 4 O 4 B	2	ja	ja	nein	nein	ja	
			5 G 4 O 6 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			gesamt	20	7 (35 %)	19 (95 %)	5 (25 %)	17 (85 %)	19 (95 %)	

19 ♂	3	Auswerter 1	0 G 0 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			0 G 1 0 1 B	1	ja	ja	nein	ja	ja	
			0 G 2 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	4	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 2 0 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 0 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 3 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 3 0 3 B	3	ja	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 0 3 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>12</b> <b>(60 %)</b>	<b>14</b> <b>(70 %)</b>	<b>3</b> <b>(15 %)</b>	<b>7</b> <b>(35 %)</b>	<b>7</b> <b>(35 %)</b>	
		Auswerter 2	0 G 0 0 1 B	2	ja	ja	ja	ja	ja	
			0 G 0 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			0 G 1 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 0 1 B	1	nein	ja	nein	ja	ja	
			1 G 1 0 2 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 1 0 3 B	3	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 2 0 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 0 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 4 B	3	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 3 0 4 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 3 0 6 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			2 G 4 0 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>16</b> <b>(80 %)</b>	<b>12</b> <b>(60 %)</b>	<b>13</b> <b>(65 %)</b>	<b>9</b> <b>(45 %)</b>	<b>9</b> <b>(45 %)</b>	
20 ♂	4-7	Auswerter 1	1 G 1 0 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 3 0 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 1 0 2 B	1	nein	ja	ja	ja	ja	
			2 G 3 0 3 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	
			4 G 2 0 4 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			5 G 2 0 4 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			6 G 6 0 7 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			>10 G >10 O >10 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>6</b> <b>(60 %)</b>	<b>6</b> <b>(60 %)</b>	<b>5</b> <b>(50 %)</b>	<b>4</b> <b>(40 %)</b>	<b>2</b> <b>(20 %)</b>	
		Auswerter 2	1 G 1 0 3 B	1	ja	ja	ja	ja	ja	
			1 G 3 0 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	
			2 G 1 0 2 B	1	nein	ja	ja	ja	ja	
			2 G 3 0 3 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	
			4 G 2 0 4 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			5 G 2 0 4 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	
			6 G 6 0 7 B	1	ja	nein	ja	nein	nein	
			>10 G >10 O >10 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>6</b> <b>(60 %)</b>	<b>6</b> <b>(60 %)</b>	<b>5</b> <b>(50 %)</b>	<b>4</b> <b>(40 %)</b>	<b>2</b> <b>(20 %)</b>	



Tab. A4 Detaillierte Auswertung der untersuchten Zelllinien bezüglich *ETS1*

Zelllinie	Ploidie-grad	Signalkonstellationen O = orange ( <i>ETS1</i> ), B = blau (Centromer Chromosom 11)		Anzahl der Zellen	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	O > B	Zugewinn in Bezug auf Ploidiegrad	Ergebnis
HDLM2	2	Auswerter 1	2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	NORMAL
			2 O 2 B	14	nein	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			3 O 3 B	2	nein	nein	nein	ja	
			6 O 5 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>5 (25 %)</b>	
		Auswerter 2	2 O 2 B	18	nein	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	
KMH2	3	Auswerter 1	1 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
			2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 4 B	15	ja	ja	nein	nein	
			3 O 3 B	2	nein	nein	nein	nein	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>17 (85 %)</b>	<b>17 (85 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	
		Auswerter 2	1 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 4 B	17	ja	ja	nein	nein	
			2 O 3 B	3	ja	ja	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>22</b>	<b>22 (100 %)</b>	<b>21 (95 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

L428	4	Auswerter 1	3 O 3 B	1	nein	ja	nein	nein	ZUGEWINN
			4 O 2 B	3	nein	nein	ja	nein	
			4 O 4 B	8	nein	nein	nein	nein	
			5 O 4 B	2	nein	nein	ja	ja	
			5 O 5 B	2	nein	nein	nein	ja	
			6 O 4 B	3	nein	nein	ja	ja	
			7 O 5 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	
		Auswerter 2	3 O 3 B	1	nein	ja	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			4 O 3 B	2	nein	nein	ja	nein	
			4 O 4 B	9	nein	nein	nein	nein	
			5 O 4 B	4	nein	nein	ja	ja	
			6 O 4 B	1	nein	nein	ja	ja	
			7 O 4 B	2	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>7 (35 %)</b>	
L540	2-3	Auswer-ter 1	2 O 2 B	13	nein	nein	nein	nein	NORMAL
			3 O 2 B	7	nein	nein	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>7 (35 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswer-ter 2	2 O 2 B	17	nein	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	4	nein	nein	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>4 (19 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

L1236	3	Auswerter 1	4 O 3 B	15	nein	nein	ja	ja	ZUGEWINN
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			5 O 3 B	2	nein	nein	ja	ja	
			7 O 6 B	1	nein	nein	ja	ja	
			8 O 6 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	
		Auswerter 2	4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 3 B	14	nein	nein	ja	ja	
			5 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			6 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			8 O 6 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	

SUPHD1	2	Auswerter 1	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
			1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	11	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	4	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>14 (70 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	13	ja	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	4	nein	nein	nein	nein	
			2 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>16 (76 %)</b>	<b>16 (76 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

UHO1	2	Auswerter 1	2 O 1 B	5	nein	nein	ja	nein	NORMAL
			2 O 2 B	6	nein	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>15</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>9 (60 %)</b>	<b>4 (27 %)</b>	
		Auswerter 2	1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	7	nein	nein	ja	nein	
			2 O 2 B	7	nein	nein	nein	nein	
			3 O 1 B	2	nein	nein	ja	ja	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>12 (60 %)</b>	<b>5 (25 %)</b>	

Tab. A5 Detaillierte Auswertung der untersuchten primären cHL-Fälle bezüglich *ETS1*

Nummer	Ploidie-grad	Signalkonstellationen in CD30 positiven Zellen  O = orange ( <i>ETS1</i> ), B = blau (Centromer Chromosom 11)		Anzahl der Zellen	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	O > B	Zugewinn in Bezug auf Ploidiegrad	Ergebnis
1	3-4	Auswerter 1	1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
			2 O 2 B	4	nein	ja	nein	nein	
			2 O 4 B	3	ja	ja	nein	nein	
			3 O 3 B	3	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 4 B	4	nein	nein	nein	nein	
			4 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

Auswerter 2	0 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
	1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
	1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
	2 O 1 B	1	nein	ja	ja	nein	
	2 O 2 B	2	nein	ja	nein	nein	
	2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
	2 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
	3 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
	3 O 3 B	3	nein	nein	nein	nein	
	4 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	
	4 O 4 B	3	nein	nein	nein	nein	
	4 O 5 B	2	ja	nein	nein	nein	
	4 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	
	5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
	5 O 7 B	1	ja	nein	nein	ja	
	6 O 6 B	1	nein	nein	nein	ja	
	<b>gesamt</b>	<b>22</b>	<b>8 (36 %)</b>	<b>8 (36 %)</b>	<b>4 (18 %)</b>	<b>3 (14 %)</b>	

2	2 oder 4	Auswerter 1	0 O 1 B	2	ja	ja	nein	nein	DELETION
			0 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	3	nein	nein	nein	nein	
			1 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	4	nein	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>18</b>	<b>9 (50 %)</b>	<b>9 (50 %)</b>	<b>1 (6 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	5	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	3	nein	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	5	ja	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			2 O 2 B	4	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	
			3 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			3 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>22</b>	<b>12 (55 %)</b>	<b>14 (64 %)</b>	<b>3 (14 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	



3	3	Auswerter 1	2 O 2 B	4	nein	ja	nein	nein	DELETION
			2 O 5 B	1	ja	ja	nein	nein	
			3 O 3 B	5	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 1 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	
			6 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>14</b>	<b>2 (14 %)</b>	<b>5 (36 %)</b>	<b>2 (14 %)</b>	<b>3 (21 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 0 B	1	nein	ja	nein	nein	
			1 O 0 B	1	nein	ja	ja	nein	
			1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	ja	ja	nein	
			2 O 2 B	4	nein	ja	nein	nein	
			2 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			3 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	4	nein	nein	nein	nein	
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	2	nein	nein	nein	ja	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>7 (35 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	
4	2 oder 4	Auswerter	nicht durchgeführt						

5	3-4	Auswerter 1	0 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
			1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	3	nein	ja	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	
			2 O 6 B	1	ja	ja	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	2	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 4 B	2	nein	nein	nein	nein	
			4 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	
			5 O 4 B	1	nein	nein	ja	ja	
			5 O 5 B	2	nein	nein	nein	ja	
			5 O 10 B	1	ja	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	

		Auswerter 2	1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	DELETION
			1 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	ja	ja	nein	
			2 O 2 B	4	nein	ja	nein	nein	
			2 O 3 B	4	ja	ja	nein	nein	
			2 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	
			4 O 4 B	2	nein	nein	nein	nein	
			4 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			6 O 9 B	1	ja	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>9 (43 %)</b>	<b>14 (67 %)</b>	<b>3 (14 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	

6	2-3	Auswerter 1	2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	ZUGEWINN
			3 O 3 B	3	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 2 B	2	nein	nein	ja	ja	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	
			6 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>1 (10 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>4 (40 %)</b>	<b>5 (50 %)</b>	
		Auswerter 2	2 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	nein	
			4 O 1 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 3 B	14	nein	nein	ja	ja	
			4 O 8 B	1	ja	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>17 (85 %)</b>	<b>16 (80 %)</b>	
7	2-3	Auswerter 1	1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	NORMAL
			2 O 2 B	6	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	10	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>5 (24 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			2 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	5	nein	nein	nein	nein	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>1 (10 %)</b>	<b>1 (10 %)</b>	<b>2 (20 %)</b>	<b>1 (10 %)</b>	

8	2	Auswerter 1	1 O 1 B	3	nein	ja	nein	nein	NORMAL
			1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	14	nein	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	
		Auswerter 2	1 O 1 B	4	nein	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			2 O 2 B	15	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>5 (24 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
9	2-3	Auswerter	nicht auswertbar						
10	3-4	Auswerter	nicht auswertbar						

11	3-4	Auswerter 1	0 0 0 B	1	nein	ja	nein	nein	DELETION
			0 0 1 B	2	ja	ja	nein	nein	
			0 0 2 B	11	ja	ja	nein	nein	
			0 0 3 B	3	ja	ja	nein	nein	
			1 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 0 2 B	2	nein	ja	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>17 (85 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 0 B	2	nein	ja	nein	nein	
			0 0 1 B	3	ja	ja	nein	nein	
			0 0 2 B	6	ja	ja	nein	nein	
			0 0 3 B	7	ja	ja	nein	nein	
			0 0 5 B	2	ja	ja	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>18 (90 %)</b>	<b>20 (100 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

12	2-4	Auswerter 1	0 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	DELETION
			0 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	3	ja	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>10 (50 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	
			0 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	3	ja	nein	nein	nein	
			3 O 2 B	2	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>10 (50 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	

13	2 oder 4	Auswerter 1	1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	DELETION
			1 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	
			1 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	6	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	3	ja	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	2	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>11 (55 %)</b>	<b>8 (40 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			1 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	3	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	4	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	6	nein	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	



14	2-3	Auswerter 1	1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	NORMAL
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	
			2 O 2 B	8	nein	nein	nein	nein	
			2 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	6	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	4	nein	nein	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 3 B	7	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			5 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>4 (20 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>4 (20 %)</b>	

15	4-5	Auswerter 1	1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	DELETION
			2 O 2 B	3	nein	ja	nein	nein	
			2 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	ja	ja	nein	
			3 O 3 B	7	nein	ja	nein	nein	
			3 O 4 B	2	ja	ja	nein	nein	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>19</b>	<b>4 (21 %)</b>	<b>17 (89 %)</b>	<b>2 (11 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			2 O 2 B	4	nein	ja	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	ja	ja	nein	
			3 O 3 B	6	nein	ja	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	
			4 O 4 B	3	nein	nein	nein	nein	
			5 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>15 (75 %)</b>	<b>3 (15 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
16	2	Auswerter	keine HRS-Zellen						

17	2	Auswerter 1	0 0 0 B	1	nein	ja	nein	nein	DELETION
			0 0 1 B	4	ja	ja	nein	nein	
			0 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 0 0 B	2	nein	ja	ja	nein	
			1 0 1 B	3	nein	ja	nein	nein	
			1 0 2 B	8	ja	ja	nein	nein	
			2 0 2 B	1	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13 (65 %)</b>	<b>19 (95 %)</b>	<b>2 (10 %)</b>	<b>0 (0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 0 0 B	3	nein	ja	nein	nein	
			0 0 1 B	2	ja	ja	nein	nein	
			0 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	
			1 0 0 B	1	nein	ja	ja	nein	
			1 0 1 B	5	nein	ja	nein	nein	
			1 0 2 B	2	ja	ja	nein	nein	
			2 0 2 B	1	nein	nein	nein	nein	
			2 0 3 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 0 3 B	1	nein	nein	nein	ja	
			2 0 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>9 (45 %)</b>	<b>14 (70 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	<b>1 (5 %)</b>	

18	3	Auswerter 1	2 O 2 B	3	nein	ja	nein	nein	NORMAL
			3 O 3 B	5	nein	nein	nein	nein	
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	5	nein	nein	nein	ja	
			5 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>15</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>3 (20 %)</b>	<b>2 (13 %)</b>	<b>7 (47 %)</b>	
		Auswerter 2	2 O 1 B	2	nein	ja	ja	nein	
			2 O 2 B	5	nein	ja	nein	nein	
			3 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
			3 O 3 B	12	nein	nein	nein	nein	
			3 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	
			3 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 3 B	1	nein	nein	ja	ja	
			4 O 4 B	5	nein	nein	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>30</b>	<b>3 (10 %)</b>	<b>7 (23 %)</b>	<b>5 (17 %)</b>	<b>7 (23 %)</b>	
19	3	Auswerter	nicht auswertbar						

20	4-7	Auswerter 1	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
			1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	
			2 O 0 B	1	nein	ja	ja	nein	
			2 O 2 B	7	nein	ja	nein	nein	
			2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
			3 O 3 B	4	nein	ja	nein	nein	
			3 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
			4 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
			4 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	
			6 O 6 B	2	nein	nein	nein	nein	
			8 O 8 B	1	nein	nein	nein	ja	
			gesamt	21	3 (14 %)	16 (76 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	

Auswerter 2	0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	DELETION
	0 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	
	1 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
	2 O 2 B	2	nein	ja	nein	nein	
	2 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	
	3 O 3 B	3	nein	ja	nein	nein	
	3 O 4 B	2	ja	ja	nein	nein	
	4 O 4 B	5	nein	nein	nein	nein	
	6 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	
	6 O 4 B	1	nein	nein	ja	nein	
	6 O 6 B	1	nein	nein	nein	nein	
	7 O 7 B	1	nein	nein	nein	nein	
	8 O 8 B	1	nein	nein	nein	ja	
	9 O 5 B	1	nein	nein	ja	ja	
	10 O 10 B	1	nein	nein	nein	ja	
	>10 O >10 B	1	nein	nein	nein	ja	
	<b>gesamt</b>	<b>24</b>	<b>6 (25 %)</b>	<b>11 (46 %)</b>	<b>3 (12 %)</b>	<b>4 (17 %)</b>	

21	4	Auswerter 1	3 O 2 B	1	nein	ja	ja	nein	ZUGEWINN
			4 O 4 B	3	nein	nein	nein	nein	
			5 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			6 O 4 B	3	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>8</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>1 (12 %)</b>	<b>5 (62 %)</b>	<b>4 (50 %)</b>	
		Auswerter 2	3 O 2 B	1	nein	ja	ja	nein	
			3 O 3 B	1	nein	ja	nein	nein	
			4 O 4 B	2	nein	nein	nein	nein	
			5 O 2 B	1	nein	nein	ja	ja	
			5 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	
			6 O 4 B	1	nein	nein	ja	ja	
			8 O 7 B	1	nein	nein	ja	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>8</b>	<b>0 (0 %)</b>	<b>2 (25 %)</b>	<b>4 (50 %)</b>	<b>4 (50 %)</b>	

Tab. A6 Detaillierte Auswertung der untersuchten primären cHL-Fälle bezüglich *BCOR* und *BCORL1*

Fall und Geschlecht	Ploidiegrad	Signalkonstellationen in CD30+ Zellen G = grün (BCOR), O = orange (BCORL1), B = blau (Centromer X-Chromosom)	Anzahl der Zellen	G < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	G > B	Zugewinn in Bezug auf Ploidiegrad	O < B	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	O > B	Zugewinn in Bezug auf Ploidiegrad	Deletion in Bezug auf Ploidiegrad	Zugewinn in Bezug auf Ploidiegrad	Ergebnis		
1 ♂	3-4	Auswerter 1	1 G 1 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	DELETION BCOR UND BCORL1	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein		nein
			1 G 2 O 2 B	5	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		nein
			1 G 3 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein		nein
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein		nein
			2 G 1 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein		nein
			2 G 3 O 3 B	4	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein		nein
			3 G 3 O 4 B	3	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja		ja
			gesamt	20	15 (75 %)	11 (55 %)	0 (0 %)	3 (15 %)	6 (30 %)	5 (25 %)	3 (15 %)	8 (40 %)	3 (15 %)	3 (15 %)		
		Auswerter 2	1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja		nein
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja		nein
			1 G 2 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		nein
			1 G 1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja		nein
			1 G 2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein		nein
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein		nein
			1 G 4 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein		nein
			2 G 1 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein		nein
			2 G 2 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		nein
			2 G 3 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein		nein
			2 G 2 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein		nein
			2 G 3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein		nein
			4 G 6 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja		ja
			gesamt	20	11 (55 %)	12 (60 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	7 (35 %)	8 (40 %)	1 (5 %)	5 (25 %)	6 (30 %)	1 (5 %)		



2 ♂	2 oder 4	Auswerter 1	1 G 1 O 0 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	NORMAL
			1 G 1 O 1 B	9	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	8	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	1 (5 %)	0 (0 %)	2 (10 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	
		Auswerter 2	0 G 0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 0 O 1 B	2	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 1 B	7	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 1 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	2	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
	2 G 2 O 1 B		2	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein		
	2 G 2 O 2 B		2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein		
	2 G 2 O 3 B		1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein		
	3 G 3 O 2 B		1	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja		
3 G 3 O 3 B	1		nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja			
gesamt	20	4 (20 %)	1 (5 %)	3 (15 %)	2 (10 %)	4 (20 %)	3 (15 %)	4 (20 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	2 (10 %)				
3 ♀	3	Auswerter	nicht auswertbar												

4 ♀	2 oder 4	Auswerter 1	1 G 0 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	NORMAL
			2 G 2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	16	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 3 O 3 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 4 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	0 (0 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	
		Auswerter 2	1 G 0 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	11	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 2 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 3 B	2	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 2 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			gesamt	19	3 (16 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	3 (16 %)	2 (11 %)	3 (16 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	

5 ♀	3-4	Auswerter 1	1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	NROMAL
			2 G 2 O 2 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			2 G 3 O 2 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			3 G 2 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 3 B	6	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 4 O 4 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 4 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 5 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			5 G 3 O 4 B	1	nein	nein	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			5 G 4 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			5 G 5 O 5 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			7 G 7 O 7 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	1 (5 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	6 (30 %)	4 (20 %)	3 (15 %)	2 (10 %)	5 (25 %)	2 (10 %)	4 (20 %)	
		Auswerter 2	1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			2 G 3 O 2 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			3 G 1 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 3 B	4	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 2 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			3 G 4 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			3 G 4 O 2 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			4 G 3 O 4 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 4 O 4 B	4	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 4 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			5 G 4 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			5 G 5 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			6 G 6 O 6 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	21	3 (14 %)	4 (19 %)	2 (10 %)	3 (14 %)	6 (29 %)	5 (24 %)	3 (14 %)	2 (10 %)	3 (14 %)	2 (10 %)	

6 ♂	2-3	Auswerter 1	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	DELETION BCORL1
			1 G 0 0 1 B	4	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 0 0 2 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 0 0 2 B	3	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 0 2 B	4	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	3 (15 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	14 (70 %)	9 (45 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	
		Auswerter 2	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 0 0 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 1 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 0 0 1 B	7	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	2	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 0 0 2 B	2	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 0 2 B	3	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 1 0 3 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			4 G 0 0 3 B	1	nein	nein	ja	ja	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	5 (25 %)	3 (15 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	18 (90 %)	12 (60 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	2 (10 %)	0 (0 %)	

7 ♂	2-3	Auswerfer 1	0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 0 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 2 B	11	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			2 G 1 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	18 (90 %)	18 (90 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	18 (90 %)	20 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	18 (90 %)	0 (0 %)	
		Auswerfer 2	0 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 0 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 2 B	13	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 3 B	2	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			gesamt	20	18 (90 %)	20 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	19 (95 %)	17 (85 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	17 (85 %)	0 (0 %)	
8 ♂	2	Auswerfer 1	1 G 0 O 1 B	3	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	NORMAL
			1 G 1 O 1 B	16	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 3 B	1	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	1 (5 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	4 (20 %)	3 (15 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	
		Auswerfer 2	0 G 0 O 0 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 0 O 1 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 1 B	16	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	1 (5 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	2 (10 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	

9 ♂	2-3	Auswerfer 1	0 G 0 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	NORMAL
			1 G 1 O 1 B	5	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	8	1 (12 %)	1 (12 %)	0 (0 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	0 (0 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	
		Auswerfer 2	0 G 0 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 1 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			3 G 4 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	
			gesamt	8	2 (25 %)	2 (25 %)	0 (0 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	1 (12 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	2 (25 %)	
10 ♀	3-4	Auswerfer	keine HRS-Zellen												

11 ♀	3-4	Auswerter 1	2 G 4 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ZUGEWINN BCORL1
			3 G 4 O 3 B	3	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			3 G 4 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 6 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			3 G 6 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			4 G 8 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			5 G 5 O 4 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	
			gesamt	10	5 (50 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	1 (10 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	7 (70 %)	4 (40 %)	0 (0 %)	1 (10 %)	
		Auswerter 2	1 G 2 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			3 G 3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 4 O 3 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			3 G 4 O 4 B	6	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 3 O 5 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			3 G 6 O 4 B	2	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			3 G 6 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			5 G 8 O 8 B	1	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			6 G 6 O 6 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			6 G 8 O 8 B	1	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			8 G 10 O 10 B	1	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	17 (85 %)	3 (15 %)	0 (0 %)	4 (20 %)	3 (15 %)	3 (15 %)	4 (20 %)	7 (35 %)	3 (15 %)	4 (20 %)	

12 ♂	2-4	Auswerfer 1	0 G 1 O 1 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	DELETION BCOR UND BCORL1
			1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 2 B	7	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			gesamt	20	15 (75 %)	19 (95 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (20 %)	12 (60 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	11 (55 %)	0 (0 %)	
		Auswerfer 2	0 G 0 O 0 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 2 B	8	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 O 1 B	1	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			2 G 4 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			gesamt	20	12 (60 %)	17 (75 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	1 (5 %)	8 (40 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	7 (35 %)	0 (0 %)	



13 ♀	2 oder 4	Auswerter 1	0 G 2 O 1 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	DELETION BCOR
			0 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 4 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 6 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>10</b>	<b>9</b> <b>(90 %)</b>	<b>8</b> <b>(80 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>4</b> <b>(40 %)</b>	<b>1</b> <b>(10 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	
		Auswerter 2	0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 2 O 2 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			0 G 3 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 0 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 2 B	3	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 4 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>13</b> <b>(65 %)</b>	<b>19</b> <b>(95 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>3</b> <b>(15 %)</b>	<b>4</b> <b>(20 %)</b>	<b>7</b> <b>(35 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>4</b> <b>(20 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	

14 ♀	2-3	Auswerter 1	2 G 2 O 2 B	5	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
			2 G 2 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			3 G 2 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			4 G 3 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			4 G 6 O 6 B	1	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			4 G 4 O 4 B	3	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			5 G 3 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			6 G 5 O 6 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			6 G 6 O 6 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			7 G 7 O 7 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			8 G 7 O 8 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			8 G 7 O 10 B	1	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			<b>gesamt</b>	<b>19</b>	<b>3</b> <b>(16 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>12</b> <b>(63 %)</b>	<b>7</b> <b>(37 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>10</b> <b>(53 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>10</b> <b>(53 %)</b>
		Auswerter 2	1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein
			1 G 2 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
			2 G 2 O 2 B	5	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein
			3 G 1 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein
			3 G 2 O 3 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			3 G 4 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein
			4 G 3 O 4 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			4 G 4 O 6 B	1	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			5 G 3 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein
			5 G 4 O 5 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			5 G 5 O 5 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			6 G 5 O 6 B	1	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			7 G 7 O 7 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			7 G 8 O >10 B	1	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja
			9 G 9 O 9 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja
			<b>gesamt</b>	<b>21</b>	<b>5</b> <b>(24 %)</b>	<b>2</b> <b>(10 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>11</b> <b>(52 %)</b>	<b>10</b> <b>(48 %)</b>	<b>2</b> <b>(10 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>10</b> <b>(48 %)</b>	<b>1</b> <b>(5 %)</b>	<b>9</b> <b>(43 %)</b>

ZUGEWINN BCOR UND BCORL1

15 ♀	4-5	Auswerter 1	1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein
			1 G 2 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein
1 G 2 O 2 B	1		ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
2 G 1 O 3 B	1		ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
2 G 2 O 2 B	6		nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
2 G 3 O 2 B	1		nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein		
2 G 3 O 4 B	1		ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
3 G 1 O 3 B	1		nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
3 G 3 O 2 B	2		nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein		
3 G 3 O 3 B	2		nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
3 G 3 O 4 B	2		ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein		
4 G 4 O 3 B	1		nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein		
gesamt			20	5 (25 %)	19 (95 %)	3 (15 %)	0 (0 %)	5 (25 %)	19 (95 %)	5 (25 %)	0 (0 %)	17 (85 %)	0 (0 %)	
Auswerter 2	1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
	1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
	2 G 2 O 2 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
	2 G 3 O 2 B	3	nein	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	ja	nein		
	2 G 2 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
	2 G 3 O 3 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
	3 G 2 O 3 B	1	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
	3 G 3 O 3 B	7	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein		
	3 G 3 O 4 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein		
	3 G 4 O 4 B	2	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein		
	5 G 4 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein		
	gesamt		20	7 (35 %)	19 (95 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	5 (25 %)	17 (85 %)	3 (15 %)	0 (0 %)	19 (95 %)	0 (0 %)	
	DELETION BCOR UND BCORL1													

16 ♂	2	Auswerter 1	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	NORMAL
			1 G 0 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	16	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	2	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	1 (5 %)	1 (5 %)	0 (0 %)	2 (10 %)	2 (10 %)	2 (10 %)	0 (0 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	
		Auswerter 2	0 G 1 0 0 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 0 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	5	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 1 B	1	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	
			gesamt	8	0 (0 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	1 (12 %)	2 (25 %)	1 (12 %)	0 (0 %)	1 (12 %)	
17 ♂	2	Auswerter 1	1 G 0 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ZUGEWINN BCOR UND BCORL1
			1 G 1 0 1 B	4	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 1 0 2 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			1 G 2 0 2 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			1 G 2 0 1 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	11	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			2 G 3 0 2 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	ja	
			gesamt	20	2 (10 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	12 (60 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	2 (10 %)	14 (70 %)	0 (0 %)	12 (60 %)	
		Auswerter 2	0 G 0 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 2 0 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			1 G 1 0 1 B	2	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 1 0 1 B	2	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 0 2 B	13	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			2 G 2 0 3 B	1	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	ja	
			gesamt	20	3 (15 %)	2 (10 %)	2 (10 %)	16 (80 %)	2 (10 %)	1 (5 %)	1 (5 %)	15 (75 %)	1 (5 %)	14 (70 %)	

18 ♀	3	Auswerter	nicht durchgeführt												
19 ♂	3	Auswerter 1	0 G 0 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	DELETION BCOR UND BCORL1
			0 G 1 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 2 O 1 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 1 B	4	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 2 B	4	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 3 B	3	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			3 G 3 O 3 B	1	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>12</b> <b>(60 %)</b>	<b>14</b> <b>(70 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>1</b> <b>(5 %)</b>	<b>3</b> <b>(15 %)</b>	<b>7</b> <b>(35 %)</b>	<b>3</b> <b>(15 %)</b>	<b>4</b> <b>(20 %)</b>	<b>7</b> <b>(35 %)</b>	<b>1</b> <b>(5 %)</b>	
		Auswerter 2	0 G 0 O 1 B	2	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 0 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			0 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 1 B	1	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 1 O 3 B	3	ja	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	ja	nein	
			1 G 2 O 1 B	2	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	
			1 G 2 O 2 B	1	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 2 O 2 B	1	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	
			2 G 2 O 4 B	3	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	
			2 G 3 O 4 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	
			2 G 3 O 6 B	1	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	
			2 G 4 O 3 B	1	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	
			<b>gesamt</b>	<b>20</b>	<b>16</b> <b>(80 %)</b>	<b>12</b> <b>(60 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	<b>13</b> <b>(65 %)</b>	<b>9</b> <b>(45 %)</b>	<b>3</b> <b>(15 %)</b>	<b>4</b> <b>(20 %)</b>	<b>9</b> <b>(45 %)</b>	<b>0</b> <b>(0 %)</b>	



## **8 Danksagungen**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herr Prof. Dr. med. Reiner Siebert, dem Direktor des Instituts für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, für die Möglichkeit an seinem Institut zu promovieren sowie die stets konstruktive Unterstützung bedanken.

Ursula Schnaidt danke ich für die Einführung in die Labormethoden, die technische Unterstützung und sehr angenehme Arbeitsatmosphäre. Reina Zühlke-Jenisch danke ich für Unterstützung bei der Auswertung sowie technische Hilfestellungen.

Dr. med. Kristian Ewald danke ich für das unermüdliche Korrekturlesen und die Hilfe und Unterstützung während des Schreibprozesses.

Prof. Dr. med. Wolfram Klapper und Charlotte Botz-von Drathen von der Sektion für Hämatopathologie vom Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials.

Prof. Dr. phil. nat. Andreas Bräuninger vom Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Gießen danke ich für die Bereitstellung von Zelllinien.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Maciej Giefing, inzwischen ehemaliger Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik, für Anregungen und Kommentare, die Arbeit als zweiter Auswerter und die exzellente und stets zuverlässige Betreuung.

Gewidmet ist die Arbeit in großer Dankbarkeit meinen Eltern Dres. Brigitte und Erich Overbeck.

## **9 Lebenslauf und Veröffentlichungen**

### *Persönliche Daten*

Name Birte Malaika Overbeck

Geburtsdatum 17.11.1987

Geburtsort Wedel (Holstein)

### *Schulbildung*

2007 Allgemeine Hochschulreife am Lise-Meitner-Gymnasium,  
Hamburg

07/2004-06/2005 Schüleraustausch in Timaru, Neuseeland

### *Hochschulbildung*

2007-2009 Vorklinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel

2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

2009-2013 Klinisches Studium der Humanmedizin an der Christian-  
Albrechts-Universität zu Kiel

09/2011-02/2012 Auslandssemester in Posen, Polen

2013 Beginn Praktisches Jahr im Rahmen des Medizinstudiums

1. Tertial: Innere Medizin, Flensburg

2. Tertial: Pädiatrie, Städtisches Krankenhaus Kiel

3. Tertial: Chirurgie, UKSH, Campus Kiel

2014 voraussichtlich 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### *Promotion*

2011-2014 Anfertigung der Dissertation am Institut für Humangenetik im  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der  
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel mit dem Thema:  
Chromosomale Imbalancen an Genorten für Transkriptions-  
faktoren als Ursache der „Lost-B-Cell-Identity“ von Hodgkin-  
/Reed-Sternberg-Zellen



Teile der Arbeit wurden veröffentlicht:

**Overbeck, B. M.**, Martin-Subero, J. I., Ammerpohl, O., Klapper, W., Siebert, R. and Giefing, M. (2012): ETS1 encoding a transcription factor involved in B-cell differentiation is recurrently deleted and down-regulated in classical Hodgkin's lymphoma. *Haematologica*, 97, 1612-1614.